

LUCIANO VILELA OLIVEIRA

ESTUDO CINÉTICO DE UM EPISÓDIO AGUDO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E DE SUAS REPERCUSSÕES
IMUNOLÓGICAS E MICROCIRCULATÓRIAS EM RATOS.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

SÃO PAULO

2007

LUCIANO VILELA OLIVEIRA

ESTUDO CINÉTICO DE UM EPISÓDIO AGUDO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E DE SUAS REPERCUSSÕES
IMUNOLÓGICAS E MICROCIRCULATÓRIAS EM RATOS.

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan Hong Jung Koh

SÃO PAULO

2007

Vilela-Oliveira, Luciano

Estudo cinético de um episódio agudo de translocação bacteriana e de suas repercussões imunológicas e microcirculatórias em ratos / Luciano Vilela-Oliveira – São Paulo, 2007.

XV, 110p

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação.

Cinetic Study of acute episode of bacterial translocation and it's immunological and microcirculatory repercussion in rats.

1. translocação bacteriana. 2. linfa mesentérica. 3. GALT. 4. perfusão tecidual. 5. microcirculação. 6. intravital



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
UNIFESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA E EXPERIMENTAÇÃO
COORDENADOR: Prof. Dr José Luiz Martins

TESE DE MESTRADO

Autor: Luciano Vilela-Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh

Co-Orientadores: Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Profª Drª Rosa Maria Silva

Título: Estudo cinético de um episódio agudo de translocação bacteriana e de suas repercussões imunológicas e microcirculatórias em ratos.

MEMBROS EFETIVOS:

1- Profª Drª Ligia Ferreira Gomes

Profª Drª da faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo – USP.

2- Prof Dr Mauro Batista de Moraes

Prof Dr Associado da Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

3- Prof Dr Otelio Rigato Junior

Médico da disciplina de infectologia da Universidade de São Paulo – UNIFESP.

MEMBRO SUPLENTE:

1- Prof Dr Deomir Germano Bassi

Professor Titular de Cirurgia do Aparelho digestivo da Universidade de Taubaté – UNITAU.

PENSAMENTO

“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém há os que lutam toda a vida. Esses são
os imprescindíveis”.

Bertolt Brecht.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Hélio e Magda** pelo exemplo de família, luta, humildade e amor à Deus.

Aos meus irmãos **Frederico e Henrique** pelos exemplos e diálogos.

À minha esposa **Anna Paula** sempre comigo.

As minhas cunhadas Conceição, Cristina e Andréa, meus sobrinhos e afilhados Isabela, Danielle, Letícia, Gustavo, Sofia e João Paulo e aos meus sogros Antonio e Izabel pelos momentos alegres.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Professor Ivan** Hong Jun Koh, professor adjunto livre-docente da disciplina de Cirurgia e Experimentação da Universidade Federal de São Paulo, **orientador** deste trabalho, por sua sabedoria, paciência, atenção e tempo dispensado durante a realização deste trabalho, sendo sua orientação fundamental do início à conclusão. Exemplo a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP**, por ter me recebido como aluno do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação, possibilitando minha titulação.

Ao Prof. Dr. **Luiz Francisco Poli de Figueiredo**, Livre-Docente, Titular da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, pelo acolhimento na Disciplina.

Ao Prof. Dr. **José Luiz Martins**, Professor Adjunto, Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pelo estímulo.

À Prof^a. Dra. **Edna Frasson de Souza Montero**, Professora Afiliada ao Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. **Djalma José Fagundes**, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM, pelos ensinamentos.

À **Elaine Maria Bazzi Dantas e Valdelice Justiniano Soares**, Secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pela alegria transmitida, amizade, ajuda e desprendimento em sempre fazer o melhor.

À **Profa. Dra. Rosa Maria Silva**, Professora Associada da disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM e Co-Orientadora neste trabalho, pelas discussões e idéias muito valiosas. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Salomão**, Professor Titular da disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM, pela disponibilidade e pelas discussões e orientações sempre pertinentes para o desenvolvimento desta tese e de meu espírito crítico. Muito obrigado.

Aos **Colegas** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pela convivência, amizade e discussões.

Às colegas do laboratório de Infectologia do 15º andar do prédio de pesquisa da UNIFESP/EPM, **Natalia** e em especial à **Milena Brunialti** pela paciência, disponibilidade e ajuda fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

Aos Colegas do laboratório, **Cláudio Sabbag, Gustavo Buchelle, José de Freitas, Luciana Bruzadin, Marjorie Yuri, Ricardo Toma e Vitor Rogerio**, pela convivência diária e colaboração no desenvolver desta tese. Em especial à colega **Ana Liberatore**, mestre em ciências, e ao colega **José Luiz Menchaca-Diaz**, mestre em ciências, por aceitar-me no convívio, compreender minhas falhas e me ajudar em diversos momentos. Muito Obrigado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro, através do processo de nº05/53826-7

À **CAPS**, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo.

Lista de Figuras

Figura 1	Representação gráfica da estratégia de aquisição de linfócitos na linfa mesentérica.....	12
Figura 2	Representação gráfica da estratégia de análise de linfócitos T e B na linfa mesentérica.....	13
Figura 3	Representação gráfica da estratégia de análise de subpopulação do linfócito T.....	14
Figura 4	Representação gráfica da estratégia de análise de CD45RC (linfócito <i>naïve</i>) e CD25 (linfócito ativado) nas subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8.....	15
Figura 5	Representação gráfica da estratégia de captura, detecção e quantificação das citocinas(IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) da linfa mesentérica eferente.....	17
Figura 6	Representação gráfica dos dados da cinética de recuperação bacteriana, expressos pela média dos valores \pm desvio padrão e porcentagem de positividade da cultura dos órgãos de cada grupo.....	18
Figura 7	Fotomicrografia da região do mesentério com ênfase aos ductos linfáticos aferentes mostrando a celularidade, dos grupos Sham.e TB.....	21
Figura 8	Fotomicrografia da região do mesentério com ênfase à microcirculação sanguínea mostrando as alterações ao longo da cinética de estudo dos grupos Sham e TB.....	23
Figura 9	Representação gráfica do estudo da perfusão tecidual local (jejuno e íleo) e sistêmica (fígado e rins direito e esquerdo) ao longo da cinética, dos grupos Sham e TB.....	24
Figura 10	Representação gráfica do estudo expresso pela média \pm desvio padrão do número de leucócitos no sangue ao longo dos períodos de estudo (2 horas, 6 horas, 24 horas 72 horas e 14 dias), dos grupos Sham e TB.....	25
Figura 11	Representação gráfica do estudo expresso pela média \pm desvio padrão do número de células da linfa mesentérica eferente ao longo da cinética, dos grupos Sham e TB (infograma).....	26

Figuras 12 a 21	Representação gráfica do estudo da linfa mesentérica eferente, através da citometria de fluxo, mostrando a porcentagem das subpopulações de linfócitos da linfa mesentérica nos grupos Sham e TB ao longo da cinética.....	27 a 32
Figuras 22 a 45	Representação gráfica do estudo da comparação entre o número de células da linfa (linfograma) e a porcentagem das subpopulações celulares encontradas na citometria de fluxo ao longo da cinética de estudo dos grupos Sham e TB.....	33 a 46
Figura 46	Representação gráfica do estudo do sobrenadante da linfa mesentérica eferente para a pesquisa das citocinas IFN- γ ; IL-6 e IL-10 utilizando o teste CBA-Flex nos grupos Sham e TB.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1	Relação de anticorpos empregados para o ensaio de imunofenotipagem.....	11
Tabela 2	Painel de anticorpos utilizados em cada tubo para o ensaio de imunofenotipagem.....	12
Tabela 3	Representação das concentrações das citocinas INF- γ , IL-6 e IL-10, na linfa mesentérica eferente, \pm desvio padrão nos diferentes períodos estudados no grupos Sham e TB.....	47

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Células T CD3	Linfócito T
Células T CD45RA	Linfócito B
Células T CD4	Linfócito Tauxiliar
Células T CD8	Linfócito Tcitotóxico ou citolítico
CLP	Cecal Ligation Puncture
CAPS	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>E. coli</i>	Bactéria Escherichia coli
FMO	Falência de Múltiplos Órgãos
GALT	Tecidos linfóides associados do intestino
INF- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IgA	Imunoglobulina A
Linfócitos NK	Linfócitos Natural Killer
LNM	Linfonodos mesentéricos
MODS	Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TB	Translocação bacteriana
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Unidade formadora de colônias

Resumo

Introdução: Muitos pacientes ainda morrem devido a infecções. Crescentes relatos da literatura atual têm atribuído ao intestino o papel de agravamento de doenças graves, e/ou a sua participação na gênese da sepse por mecanismo de translocação bacteriana (TB). **Objetivo:** Avaliar de forma cinética a TB e suas repercussões microcirculatórias e imunológicas. **Método:** Ratos Wistar-EPM (n=162) foram aleatoriamente distribuídos em grupo Sham (n=72) e grupo TB (n=90), e avaliados nos períodos de 2h, 6h, 24h, 72h, 7 e 14 dias, em relação a índice de translocação bacteriana; microscopia intravital; perfusão tecidual; e componentes celulares e humorais da linfa mesentérica por linfograma, citometria de fluxo e CBA-Flex. **Resultado:** A TB ocorreu somente no grupo TB e foi expressiva nas primeiras 24 horas tornando-se negativa somente com 7 dias. A consequência de um episódio de TB repercutiu na celularidade e citocinas pró e antiinflamatórias da linfa mesentérica associado a lesões da microcirculação e hipoperfusão tecidual de forma local e sistêmica. A citometria de fluxo mostrou que a linfa mesentérica eferente pós TB difere significativamente do grupo Sham quanto a número e subpopulação de linfócitos. **Conclusão:** Um episódio agudo de TB determinou uma recuperação máxima bacteriana com 6 horas e sua completa depuração entre 3 e 7 dias, além de provocar alterações da microcirculação intestinal e sistêmica associadas à ativação do GALT, principalmente no período de permanência das bactérias translocadas no hospedeiro, sendo a via linfática mesenterial uma importante rota na intercomunicação imunológica entre o ambiente intestinal e sistêmico.

Abstract

Introduction: Many patients still die from infection. Currently, growing evidences have pointed out the role of the gut in the worsening of the critical illness, and/or its participation in the genesis of the bacterial translocation.

Objective: Evaluate the bacterial translocation (BT) kinetics and its repercussion on microcirculation and immune response.

Method: Wistar-EPM rats (n=162) were randomly distributed in Sham group (n=72) and BT group (n=90), and were monitored at 2h, 6h, 24h, 72h, 7 and 14 days periods in relation to bacterial translocation index, intravital microscopy, tissue perfusion index, and cellular and humoral components of the mesenteric lymph by lymphogram, flow cytometry and CBA-Flex. **Results:** Bacterial recovery was positive only in BT-group and it was expressive in the first 24 hours, becoming negative only after seven days. The consequences of one episode of BT could be seen in the cellularity and proinflammatory and antiinflammatory cytokines of the efferent mesenteric lymph associated to local and systemic microcirculation and tissue hypoperfusion. The flow cytometry showed that efferent mesenteric lymph after BT was significantly different as compared to Sham group in relation to lymphocytes number and their subtype. **Conclusion:** An acute episode of BT determined maximal bacterial recovery at 6h and its complete clearance occurred between 3 and 7 days, in addition to the gut and systemic microcirculation injuries due to the GALT activation, specially at the presence of translocated bacteria in the host, demonstrating the importance of the lymphatic route in the immune crosstalk between the gut and systemic environment.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Objetivos.....	5
2- MÉTODOS.....	6
3- RESULTADOS.....	18
4- DISCUSSÃO.....	49
5- CONCLUSÃO.....	59
6- REFERÊNCIAS.....	60
7- NORMAS ADOTADAS.....	68

ANEXOS

APÊNDICE

1 Introdução

Muitos pacientes ainda morrem atualmente devido a infecções. A incidência anual de pacientes com sepse, nos Estados Unidos, tem sido aproximadamente de 750.000 pessoas/ano, culminando com a morte de cerca de 215.000 pessoas/ano^{1,2} apesar do grande investimento financeiro em pesquisa e em novas modalidades diagnósticas e de tratamentos. Em nosso meio Salomão e col³, 1992 relataram incidência de 21,7 episódios de infecção na corrente sanguínea por 1000 admissões, com taxa de mortalidade de 33,4% e Silva e col⁴, 2004 mostraram incidência de 61,4 pacientes com sepse para cada 1000 pacientes–dia, com taxa de mortalidade de 34,7%.

Tal quadro despertou, durante as duas últimas décadas, o interesse de pesquisadores, resultando no aumento das pesquisas experimentais e clínicas enfocando principalmente a fisiopatologia e a terapêutica da sepse.

Recentemente, numerosos estudos^{5,6,7} têm definido e redefinido o papel do intestino na origem e piora de doenças, particularmente, na etiopatogenia da sepse, pois o mesmo alberga grande concentração bacteriana, além da observação da correlação, em 30 a 80% dos casos, entre flora microbiana intestinal e agente infeccioso isolado em pacientes com sepse⁸. Tais fatos deram origem à hipótese intestinal da sepse pelo mecanismo da translocação bacteriana (TB), processo de passagem das bactérias nativas e ou seus produtos para sítios extra-intestinais⁹.

Três fatores foram co-relacionados à ocorrência da TB: 1- sobrecrecimento da flora intestinal, 2- ruptura da barreira intestinal, e ou 3- imunossupressão do hospedeiro, os quais, proporcionariam condições para as bactérias luminais vencerem a barreira intestinal e alcançarem sítios extra-intestinais^{10,11,12,13,14,15}.

Esta invasão bacteriana pelo processo de TB pode ocorrer por duas vias até hoje descritas: a via sangüínea (via portal)¹⁰ e a via linfática (via ducto linfático mesenterial)¹⁶. A via sangüínea ocorreria pela passagem de bactérias e ou toxinas luminais pela barreira intestinal para a microcirculação da mucosa e pela veia porta alcançariam a circulação sistêmica^{10,17}. A via linfática ocorreria pela passagem de bactérias para os vasos linfáticos aferentes da mucosa, para os linfonodos mesentéricos (LNM) e depois para os ductos eferentes, ducto linfático mesenterial, ducto torácico e circulação sistêmica, via amplamente aceita por grande parte dos autores^{9,18,19,20}.

Evidências crescentes vêm salientando o papel da ação conjunta ou isolada da TB e da endotoxina do trato intestinal na piora do estado de sepse ^{2,21,22}. Nesta *hipótese intestinal* da sepse as bactérias luminais, principalmente as Gram-negativas e, entre estas, a *E. Coli* a mais freqüente ²³, e ou a endotoxina translocada induziria o fenômeno pró-inflamatório de forma sistêmica, desencadeando uma resposta inflamatória descontrolada e exacerbada, denominada de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), podendo evoluir para Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS) e conseqüente óbito ^{21,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36}.

Além disso, um dos principais fatores relacionados à disfunção da barreira intestinal tem sido o estado de hipoperfusão ³⁷ ou isquemia intestinal, que evoluiria com alteração da microcirculação e aumento da permeabilidade vascular local com subseqüente indução da TB. Tal conjunção de fatores estaria associada à ativação da resposta inflamatória sistêmica e piora da doença pré-existente, podendo culminar com a falência de múltiplos órgãos (FMO) e óbito. ^{38,39,40,41,42}.

Desta forma, na concepção atual, o intestino não é somente considerado como um sistema de absorção de nutrientes, mas também um importante sistema imunológico, que se inter-relacionaria com a imunidade sistêmica ^{43,44,45,46}. Para desempenhar a função de barreira, o intestino foi provido de um complexo mecanismo imune local com uma espessa camada de muco contendo imunoglobulina A (IgA) com capacidade bactericida, enzimas digestivas que limitam a adesão de bactérias luminais na superfície dos enterócitos ^{47,48,49,50}, motilidade intestinal que atua como fator mecânico de eliminação bacteriana intraluminal, e da camada de células epiteliais das vilosidades da mucosa com adesão firme (*"tight junction"*), dificultando a invasão bacteriana ⁵¹. Além disso, um desenvolvido sistema imunológico (GALT, do inglês gut associated lymphoid tissue) ⁵², disposto em todo o território intestinal como as placas de Peyer, os folículos linfóides, os linfonodos de mesentério, o epitélio e a lâmina própria, compostos de diferentes células imunes, que desempenham a função de ativação ou tolerância a antígenos de origem intestinal ⁵³.

Crescentes evidências atuais mostram que, em condições normais, antígenos intestinais são regularmente apresentados ao sistema imune local ⁵⁴, com o intuito de conferir o desenvolvimento progressivo da imunidade intestinal ³¹. Esta interação parece acontecer primariamente na mucosa intestinal ou, secundariamente, no linfonodo mesenterial, após contato do antígeno com uma célula apresentadora de antígeno (células M, macrófagos e células dendríticas ^{55,56,57,58}) ou ainda após

migração livre do antígeno pela linfa até o linfonodo ⁵⁹, com subsequente ativação das subpopulações linfocitárias. Após esta interação ⁶⁰, os linfócitos ativados deixariam o linfonodo mesenterial pelos vasos linfáticos eferentes, seguindo para a circulação sangüínea ⁶¹ para posteriormente retornar ao intestino como células de memória ⁶², localizando-se no tecido efector intestinal determinado ou então iriam para outras áreas de mucosa, distantes do intestino, como componentes da defesa imune das mucosas do corpo ⁶³. Este movimento é chamado recirculação linfocitária ^{64, 65} e tem papel importante na resposta imunológica adquirida.

Além da resposta celular, as células do sistema imunológico, quando ativadas, produzem citocinas, importantes mediadores da sinalização celular que participam na integração da resposta imunológica de defesa do organismo. A produção de citocinas é um estímulo coordenado a fim de regular a resposta imune, regulação esta determinada pelo equilíbrio entre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ , interleucina-1 β , interleucina-2, interleucina-6 e interleucina-8, e as citocinas antiinflamatórias como a interleucina-4, interleucina-10 e interleucina-12 ^{66,67}.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias o Interferon- γ (INF- γ), secretado principalmente por células Tauxiliar e Tcitotóxico ativadas, atua modulando a resposta imunológica, sendo um potente ativador de macrófagos. A maioria das células expressam receptor para INF- γ e, como resultado, teoricamente, qualquer célula ao redor de linfócitos secretores de INF- γ se tornaria mais eficiente ^{68,69,70}. A Interleucina-6 (IL-6)⁷¹, secretada principalmente por linfócitos T auxiliares ativados, células apresentadoras de antígeno, macrófagos e em resposta ao estímulo de IL-1 e TNF ⁷² atua principalmente como co-estimulador pró-inflamatório da resposta imunológica. Já localmente, atua na ativação dos linfócitos B, que se diferenciam em produtores de anticorpos e atuam sistemicamente induzindo a fase de resposta inflamatória aguda nos hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação denominada de resposta de fase aguda ⁶¹.

Dentre as citocinas antiinflamatórias, a Interleucina-10 (IL-10) secretada principalmente pelos linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e linfócitos B ativados ⁷³, tem sua maior atividade relacionada à inibição da produção de outras citocinas. Principalmente inibe a produção de IL-2 e Interferon via células T, o que poderia resultar na disfunção de macrófagos e de células dendríticas ^{61,73}.

Embora a barreira intestinal esteja ativa e se desenvolvendo a cada desafio, como já exposto anteriormente, uma invasão bacteriana maciça pelo processo de

TB, diferente do processo fisiológico, parece desencadear uma comunicação entre o intestino e regiões extra-intestinais, gerando uma resposta inflamatória exacerbada e de forma sistêmica provocando a instalação da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e Falência dos Múltiplos órgãos (FMO) com conseqüente óbito ^{24,25,26,27}.

Corroborando com esses achados, trabalhos anteriores do nosso laboratório sobre a TB ^{74,75}, e de outros ⁷⁶, mostraram que em grande parte, o agravamento da sepse quando combinada ao processo da TB, parece ser regulado por componentes da linfa mesentérica eferente decorrentes da ativação do GALT. Essa possível interação intestinal e sistêmica exercida pelas células da linfa mesentérica e mediadores nela presentes estariam influenciando a resposta imunológica no hospedeiro, apesar desta hipótese ser ainda pouco estudada e objeto desta pesquisa.

1.1 Objetivo

Avaliação cinética das repercussões intestinais e sistêmicas causadas por um episódio agudo de translocação bacteriana.

Objetivos específicos

1-Estudo cinético da translocação bacteriana e sua depuração.

2-Estudo cinético da relação translocação bacteriana/hospedeiro e conseqüentes repercussões intestinais e sistêmicas na microcirculação e componentes da linfa, conseqüentes à ativação do GALT.

2 Métodos

2.1 Amostra

Foram utilizados ratos Wistar-EPM, fêmeas, com peso entre 180 e 280 gramas, idade aproximada de 3m (três meses), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo - CEDEME.

Os animais permaneceram por uma semana em ambientação no biotério do laboratório experimental de transplante experimental de órgãos – UNIFESP, em gaiolas plásticas medindo 40 X 34 X 17 centímetros, com no máximo 5 animais em cada uma. O ambiente foi mantido com temperatura controlada, ao redor de 22°C, iluminação artificial e controle automático do ciclo sono vigília. Todos os animais receberam alimentação e água *ad libitum*.

2.1.1 Grupos

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos:

- 1- Grupo Sham (G-Sham): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico semelhante ao grupo TB, com injeção de 5ml de solução fisiológica 0,9% estéril (SF) no intestino delgado / 100g de peso corporal. (n= 72).
- 2- Grupo TB (G-TB): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de TB, com inoculação de 5ml de *E.coli* R6 em concentração de 1×10^{10} bactérias no intestino delgado / 100g de peso corporal. (n= 90).

2.2 Cepa bacteriana

A bactéria utilizada neste experimento foi obtida dos linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer de ratos Wistar-EPM, submetidos a antibioticoterapia (metronidazol e tetraciclina) por 10 dias. Esta bactéria, com capacidade de translocação foi classificada como *Escherichia Coli* (ONT;H2), tendo como característica resistência a tetraciclina e recebendo a denominação de *Escherichia coli* R6 (*E.coli* R6) tetraciclina resistente (*Tet^R*).

2.3 Procedimentos

2.3.1 Anestesia

A indução e manutenção de anestesia foram realizadas com Xilazina + Quetamina (1:4), intraperitonealmente, 0,1ml/100g de peso corporal, tanto na indução de TB como nos períodos de monitoramentos subsequentes.

2.3.2 Translocação bacteriana

Para indução do processo de translocação bacteriana, empregou-se o modelo de TB descrito por Koh e Silva ¹⁰ (1996) com os animais em jejum por 24h antes do experimento.

Após a anti-sepsia com álcool 70% da parede abdominal e colocação de campos cirúrgicos, a laparotomia mediana foi realizada por planos e feita a identificação e ligadura do íleo terminal. Em seguida, procedeu-se a sondagem oroduodenal, clampeamento da sonda na primeira porção do duodeno e inoculação das bactérias no grupo TB (G-TB), (10^{10} de concentração/ml, com volume de 5mL/100g de peso corporal) ou solução fisiológica no grupo Sham (solução fisiológica estéril 5ml/100g de peso). Após a inoculação, realizou-se a ligadura obstrutiva do duodeno. Ambas as ligaduras, ileal e duodenal, foram exteriorizadas por contra-abertura e fixadas na pele abdominal com algodão 4-0. Fechamento da parede abdominal em dois planos com pontos separados (algodão 4-0).

Foi feita a liberação da ligadura obstrutiva duodenal e ileal, fixadas por contra-abertura, após 2 horas do inóculo ou da solução fisiológica em todos os animais de ambos os grupos.

Todos os procedimentos foram realizados empregando microscópio cirúrgico e material microcirúrgico em condições de máxima anti-sepsia.

2.3.3 Coleta e armazenamento da linfa mesentérica

Duas horas antes dos períodos estipulados, com o animal anestesiado e posicionado, procedeu-se à abertura do abdômen seguida de identificação e dissecação do ducto linfático mesentérico eferente. A seguir, procedeu-se a abertura do ducto e cateterização com tubo de silicone (0,64 x 1,19 de diâmetro) acoplado a uma seringa de 1ml contendo 0,2ml de EDTA e o cateter foi exteriorizado pela abertura da incisão mediana e fixado à parede durante o procedimento da síntese da mesma.

A linfa foi coletada nas últimas 2 horas de cada um dos períodos de estudo (2h; 6h; 24h; 72h; 7 dias e 14 dias) e seu conteúdo foi armazenado em recipiente estéril. O tubo de silicone conectado à seringa de 1 ml permaneceu todo o tempo da coleta sobre uma superfície resfriada com gelo para a conservação de elementos da linfa.

Após a coleta, a linfa foi armazenada em ambiente resfriado com gelo, por tempo inferior a 30 minutos. Em seguida, uma parte deste conteúdo (0,2 µl) foi separada para realização do linfograma, utilizando-se a câmara de newbauer (Anexo 1). O restante (em média 0,6 µl) foi processado para armazenamento em freezer a -70°C e posterior realização dos testes de Citometria de Fluxo e CBA-Flex (Elisa).

2.3.4 Coleta de sangue , órgãos e cultura de órgãos.

Nos períodos pré-determinados (n=6/período/grupo) os órgãos baço e fígado foram identificados e de forma asséptica, realizada biópsia de cada órgão, a qual foi pesada e transferida a um recipiente estéril para a realização de cultura.

Imediatamente antes da retirada dos órgãos para a cultura, a veia cava inferior foi puncionada com agulha 30x7 acoplada à seringa de 5 mL, com 0,5mL de EDTA, e então aspirado 2 mL de sangue. Este foi imediatamente deixado em ambiente refrigerado e deste modo enviado ao laboratório central para a realização do leucograma.

2.3.5 Sacrifício dos animais.

Ao término de todos os períodos de experimento os animais foram sacrificados pela secção da aorta abdominal.

2.4 Monitoramentos.

Nos grupos Sham e TB foram realizados os seguintes monitoramentos:

- 1- Índice de translocação bacteriana nos grupos Sham e TB (n=6/período)
- 2- Microscopia intravital nos grupos Sham e TB (n=6/período)
- 3- Perfusão tecidual nos grupos Sham e TB (n=6/período)
- 4- Leucograma nos grupos Sham e TB (n=6/período)
- 5- Linfograma nos grupos Sham e TB (n=6/período)
- 6- Citometria de Fluxo no grupo Sham (n=3/período) e grupo TB (n=4/período)
- 7- CBA-Flex (ELISA) no grupo Sham (n=6/período) e grupo TB (n=9/período)

2.4.1 Índice de translocação bacteriana.

A cultura do linfonodo mesenterial (LNM), baço e fígado, foi realizada nos períodos de 2h, 6h, 24h, 72h, 7 e 14 dias (n=6/período/grupo). Com rigor asséptico, a peça foi pesada e transferida para recipiente estéril, no qual foi macerada e homogeneizada em solução salina 0,9% estéril (2 mililitros), filtrada e plaqueada (100 microlitros) em meio MacConkey (Difco) acrescido de tetraciclina (0,02g/ml). A contagem das bactérias foi realizada após 18-24 horas de incubação a 37°C e foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia/por grama de tecido (UFC/g).

2.4.2 Microscopia intravital

Nos períodos pré-determinados (n=6/período / grupo), o animal anestesiado foi posicionado em placa de vidro com a região jejunal e ileal exteriorizada, umidificada com solução fisiológica 0,9% estéril e mantida em temperatura ao redor de 37°C com placa de aquecimento. Com o animal posicionado, iniciou-se o estudo da microcirculação mesenterial com auxílio do microscópio de intravital Zeiss Axioscope-2 Plus, objetivas de 5x, 10x e 20x, acoplado a um sistema composto de duas câmeras, uma analógica e outra digital, o que permitiu o armazenamento de todas as imagens em vídeo cassete e/ou computador. As imagens analógicas foram gravadas em fita VHS e as imagens digitais no computador, usando o programa da Zeiss, Axio Vision 3.1, e o programa da Pinnacle Studio, Studio versão 8.

A observação do mesentério e seus vasos foi realizada identificando vasos de alto fluxo (arteríolas) e de baixo fluxo (vênulas e capilares) e avaliando-se principalmente alterações do estado funcional destes vasos, tais como hemorragias perivasculares, adesão leucocitária, rolamento leucocitário, lentificação e ou parada do fluxo. Além disso, também foram analisados os vasos linfáticos aferentes do mesentério quanto à sua celularidade.

2.4.3 Perfusão tecidual.

Nos períodos pré-determinados (n=6/período/grupo), os animais foram anestesiados, seus órgãos abdominais identificados e, utilizando-se o aparelho ultrasson Doppler, verificou-se a perfusão tissular do jejuno, íleo, fígado, rim direito e rim esquerdo com três mensurações por órgão. O resultado obtido foi expresso em média das três mensurações por órgão. A porção média do jejuno e íleo terminal foram mensuradas entre os pedículos vasculares, evitando a região das Placas de Peyer. O fígado foi mensurado no lobo inferior e os rins em sua porção média.

2.4.4 Leucograma sanguíneo.

Nos períodos pré-determinados (n=6/período/ grupo), os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal, os órgãos identificados e o sangue coletado foi deixado em ambiente refrigerado e deste modo enviado ao laboratório central para a realização do leucograma.

2.4.5 Linfograma.

Após a coleta da linfa, foi separado uma parte do conteúdo (0,2 µl) para realização do linfograma, utilizando-se a câmara de newbauer (Anexo 1). O restante (em média 0,6 µl) foi processado para armazenamento em freezer a -70°C e posterior realização dos testes de Citometria de Fluxo e CBA-Flex (Elisa).

2.4.6 Imunofenotipagem dos linfócitos por citometria de fluxo.

A relação de anticorpos utilizados foi definida a partir de relatos da literatura. Assim definiu-se pelo uso do anticorpo monoclonal CD45RA FITC^{77,78,79}, para a caracterização do linfócito B, e o anticorpo monoclonal CD3 PE^{80,81}, para a caracterização do linfócito T. Para a população de Linfócitos T auxiliar foi escolhido o anticorpo monoclonal CD4 APC^{82,83,84}, e para a população de Linfócitos T citotóxico o anticorpo monoclonal CD8a PerCP^{85,86}. Para a população de Linfócitos T *naïve* foi escolhido o anticorpo monoclonal CD45RC FITC^{87,88,89}, e para determinar a ativação dos linfócitos T o anticorpo monoclonal CD25 PE^{90,91,92}. Utilizou-se também os isotipos controles IgG₁-FITC e IgG₁-PE⁹³.

Tabela 1

Relação de anticorpos monoclonais utilizados, suas respectivas diluições e volumes estão contidos na tabela 1.

Anticorpo	Pré diluição	Quantidade utilizada (µl)	Clone	Isotipo	Fabricante
Anti-Rat CD45RA-FITC ¹	01:20	8	OX-33	IgG ₁	BD Bioscience Pharmigen*
Anti-Rat CD45RC-FITC	01:20	8	OX-22	IgG ₁	BD Bioscience Pharmigen
Anti-Rat CD3-PE ²	01:10	5	G4.18	IgG ₃	BD Bioscience Pharmigen
Anti-Rat CD25-PE	01:10	10	OX-39	IgG ₁	BD Bioscience Pharmigen
Anti-Rat CD8 _a -PerCP ³	01:10	5	OX-8	IgG ₁	BD Bioscience Pharmigen
Anti-Rat CD4-APC ⁴	01:10	5	OX-35	IgG _{2a}	BD Bioscience Pharmigen
IgG ₁ -FITC	01:20	8	MOPC-31C		BD Bioscience Pharmigen
IgG ₁ -PE	01:10	10	MOPC-31C		BD Bioscience Pharmigen *

San Diego, CA, EUA.

1. FITC: fluoresceína isoticianato
2. PE: ficoeritrina
3. PerCP: clorofila peridinina
4. APC: alofococianina

As amostras foram retiradas do freezer a -70°C e imediatamente colocadas em banho-maria a 37°C até completar o descongelamento. Em seguida, fez-se o acerto da concentração de células (1×10^6) e transferiram-se cem microlitros das amostras para tubos de poliestireno de 5 mL com fundo arredondado (BD Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os tubos receberam os anticorpos como descrito na tabela 2 e foram incubados no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente.

Tabela 2

Painel de anticorpos utilizados em cada tubo.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	IgG ₁	IgG ₁	CD8 _a	CD4
2	CD45RA	CD3	CD8 _a	CD4
3	CD45RC	CD25	CD8 _a	CD4

A seguir foram acrescentados 2 mL de tampão de marcação e os tubos colocados em centrifuga a 4°C e 4000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi

desprezado e foi acrescentado ao tubo 0,3 mL de PBS a 1% azida de sódio (Sigma). A imunofenotipagem foi lida em citômetro de fluxo⁹⁴ (FACSCalibur (BD Bioscience)) conforme descrito nas figuras 1 a 4. A aquisição e análise dos resultados foram realizadas através do programa CellQuest (BD Bioscience).

Aquisição e análise no citômetro de fluxo

Para a aquisição utilizou-se um gráfico de dispersão de luz frontal versus lateral. Através deste gráfico foram adquiridos 20.000 eventos, ou seja, células que tivessem morfologia de linfócito, possibilitando a delimitação de uma região denominada R1 (figura-2).

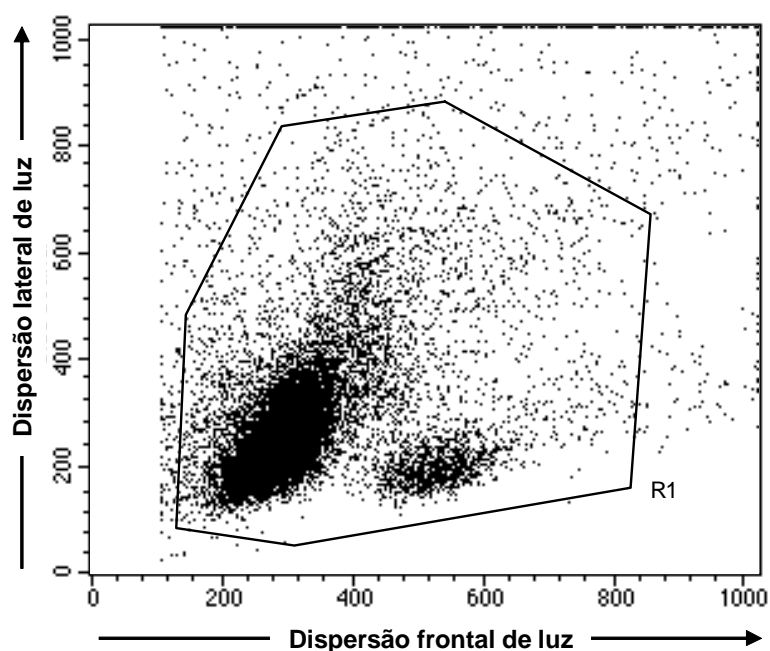


Figura 1: Estratégia de aquisição de linfócitos na linfa mesentérica. O gráfico acima mostra a dispersão frontal de luz (abcissa) e dispersão lateral de luz (ordenada), correspondendo ao tamanho e complexidade celular, respectivamente. A região 1 (R1) separa a população característica de linfócitos.

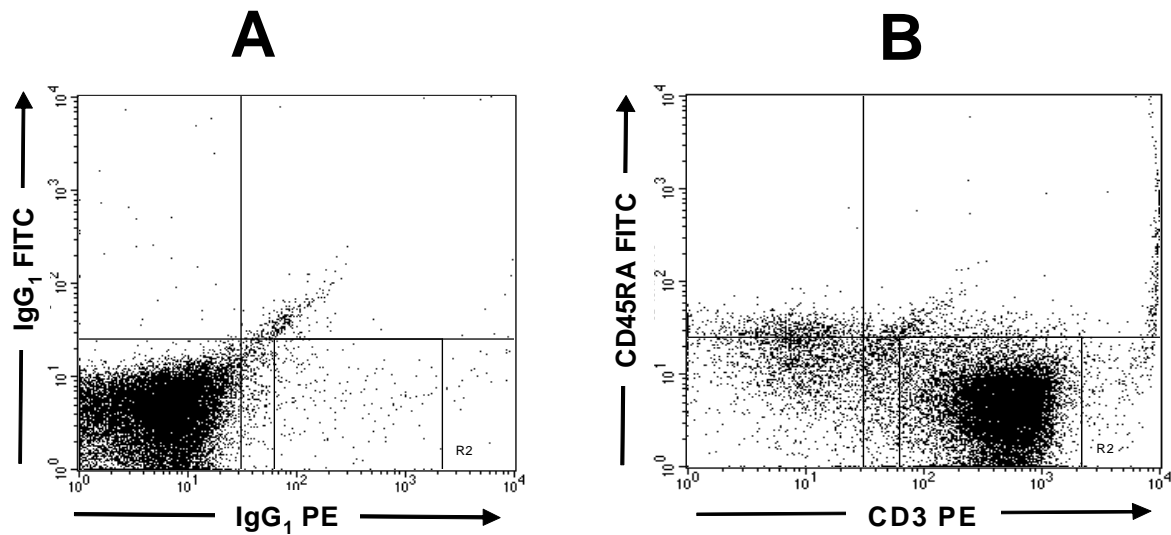


Figura 2: Estratégia de análise de linfócitos T e B na linfa mesentérica. A partir de um gráfico de dispersão frontal e lateral de luz, como mostrado na figura 1, foi delimitada uma região R1. Os eventos contidos dentro desta região foram analisados para separação de linfócitos TCD3⁺ e B (CD45RA⁺). **(A)** O gráfico mostra a dupla marcação das células para os isotipos, onde foram determinadas as populações negativas. **(B)** O gráfico mostra a delimitação de células positivas com a marcação de CD45RA⁺ e a delimitação de células positivas com a marcação de CD3⁺. Os linfócitos T foram separados através da combinação das regiões R1 e R2.

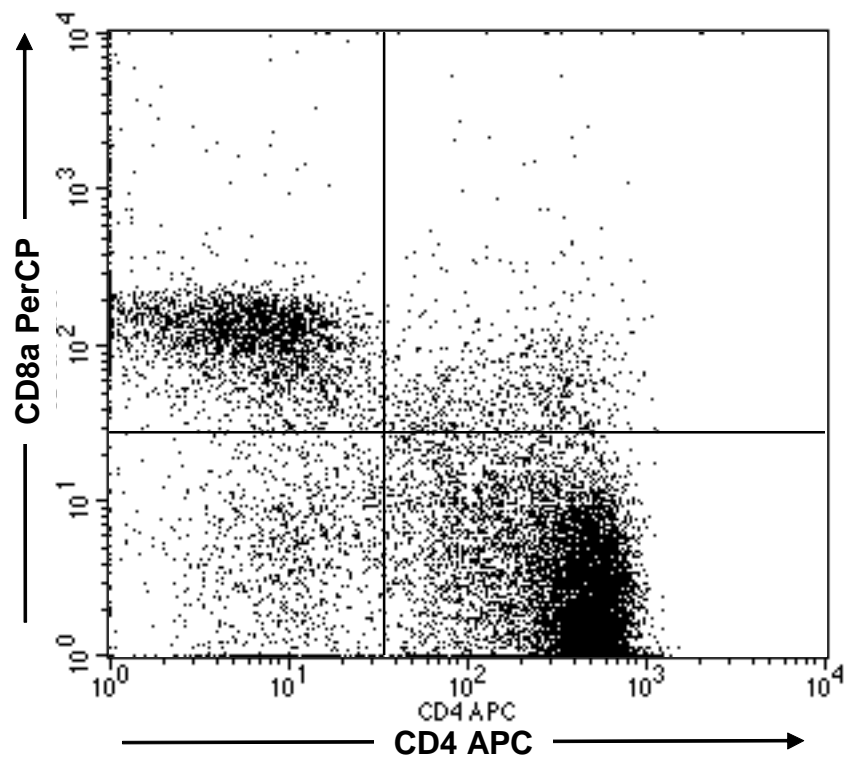


Figura 3: Estratégia de análise de subpopulações de linfócitos T. Os linfócitos T foram separados através da combinação das regiões R1 e R2, como mostrado na figura 2. Desta forma foi possível verificar a porcentagem das subpopulações de linfócitos Tauxiliar ($CD4^+$) e linfócito Tcitolítico ($CD8a^+$).

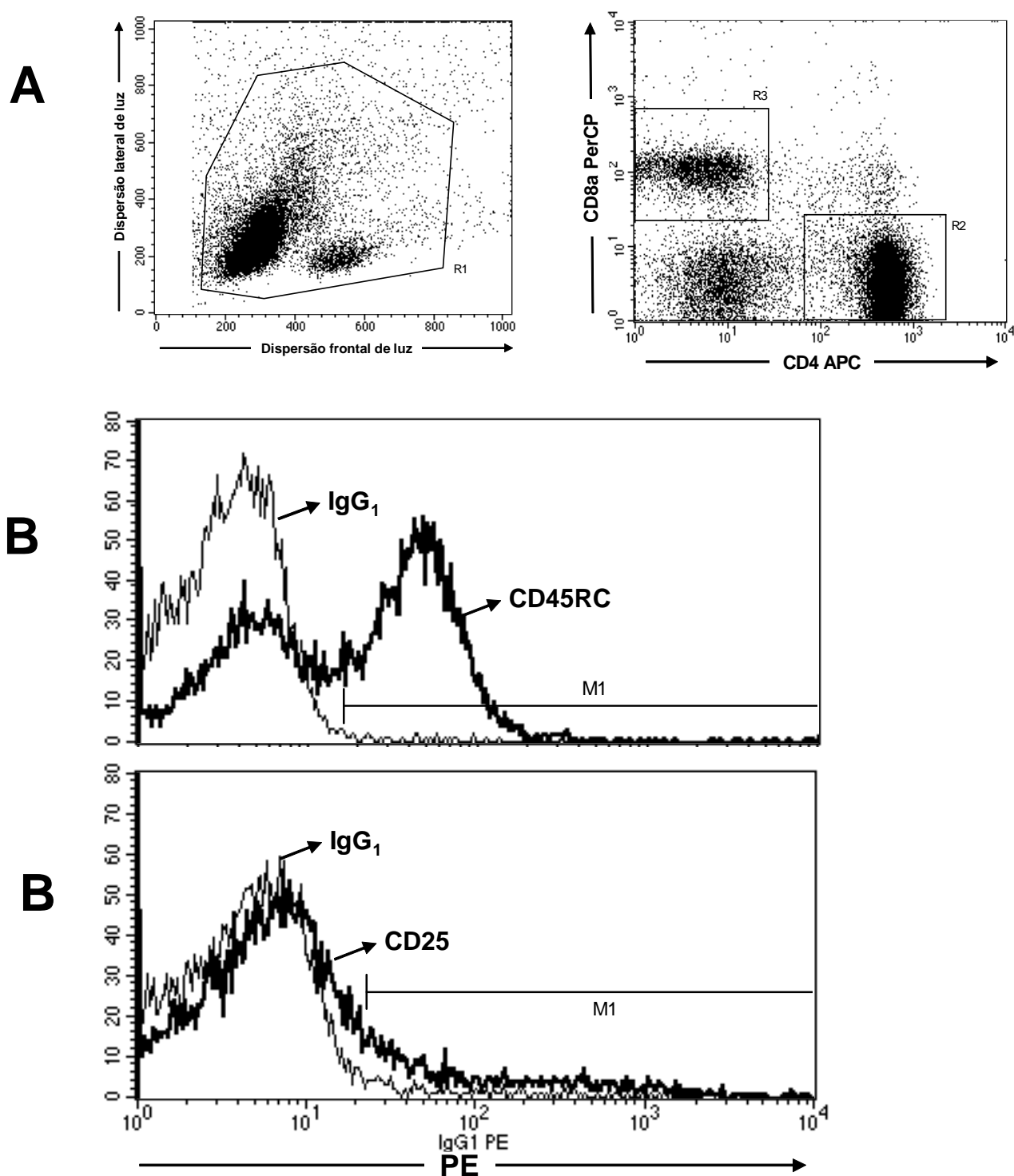


Figura 4: Estratégia de análise de $CD45RC^+$ (linfócito *naive*) e $CD25^+$ (linfócito ativado) nas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. **(A)** Na região R1 foram separados os linfócitos. A partir da combinação das regiões R1 e R2 foram separados os linfócitos T $CD4^+$ e da combinação das regiões R1 e R3 foram separados os linfócitos T $CD8^+$. **(B)** Após a separação das subpopulações de linfócitos T foi analisada por histograma a intensidade da expressão de $CD45RC^+$ dentro da marcação M1. A delimitação da região M1 foi realizada a partir do isotipo controle do

anticorpo CD45RC⁺ (primeiro gráfico). Da mesma forma foi analisada por histograma a intensidade da expressão de CD25⁺ dentro da marcação M1. A delimitação da região M1 foi realizada a partir do isotipo controle do anticorpo CD25⁺ (segundo gráfico).

2.4.7 Quantificação de citocinas na linfa mesentérica.

As amostras do sobrenadante da linfa foram retiradas do freezer a -70 e descongeladas em temperatura ambiente.

Para a quantificação das citocinas Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) da linfa mesentérica foi utilizado o teste CBA-Flex (*BD Cytometric Bead Array-Flex Set*).

O teste CBA Flex (Anexo-3) é composto por uma única população de mesmo tamanho de partículas, as quais possuem intensidade de fluorescência distinta conforme a citocina a ser mensurada. Além da fluorescência, cada partícula é revestida por anticorpos específicos para cada citocina.

A detecção das citocinas foi realizada através da adição de anticorpos específicos conjugados com fluorescência (PE),

A quantificação em pg/ml de cada citocina foi baseada em uma curva padrão, realizada com diluições conhecidas, o que possibilitou a construção de um gráfico de intensidade de PE versus pg/ml. A equação gerada a partir deste gráfico possibilitou o cálculo da concentração das citocinas nas amostras. A aquisição do teste CBA-Flex Set foi feita em citômetro FACS Canto e para a análise dos resultados utilizou-se o programa FCAP array.

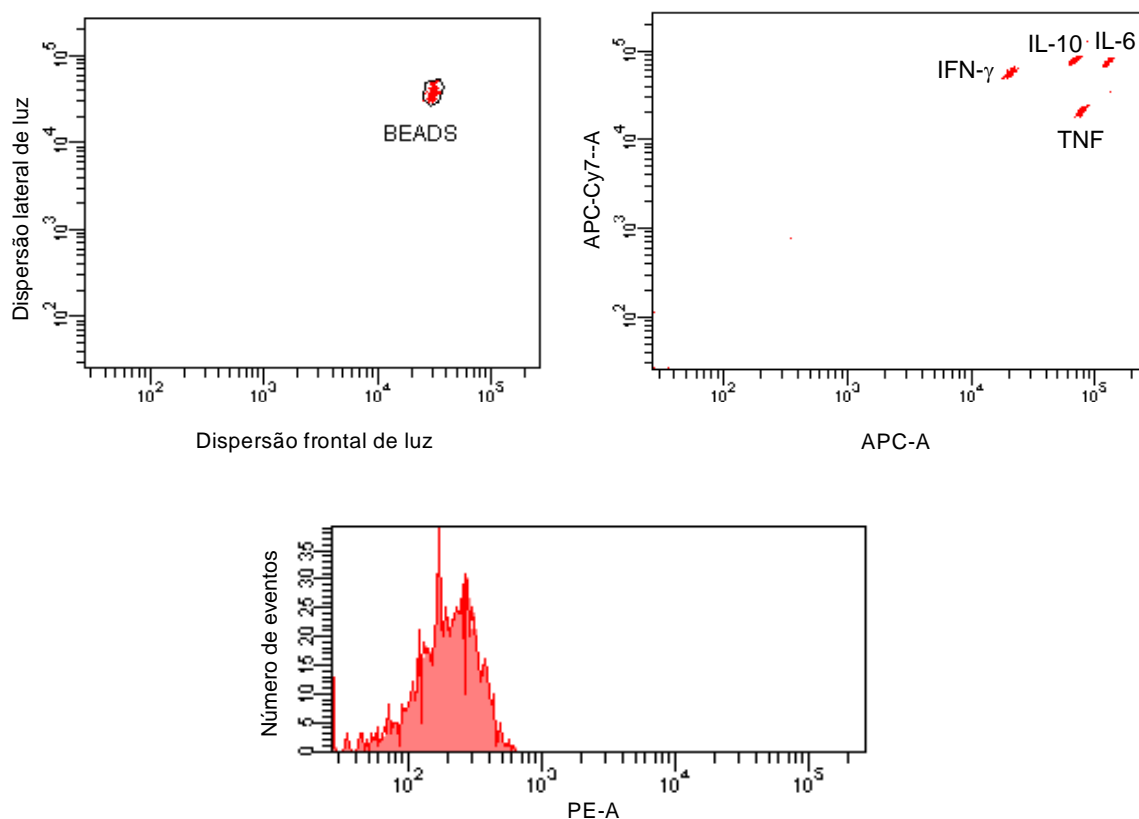


Figura 5: Estratégia de captura, detecção e quantificação das citocinas (IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) da linfa mesentérica eferente no citômetro de fluxo FACSCanto.

2.5 Análise Estatística

Para análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando em consideração as variáveis estudadas.

Para comparar as variáveis analisadas dentro de um mesmo grupo, foi realizado o Teste de variância de Friedman.

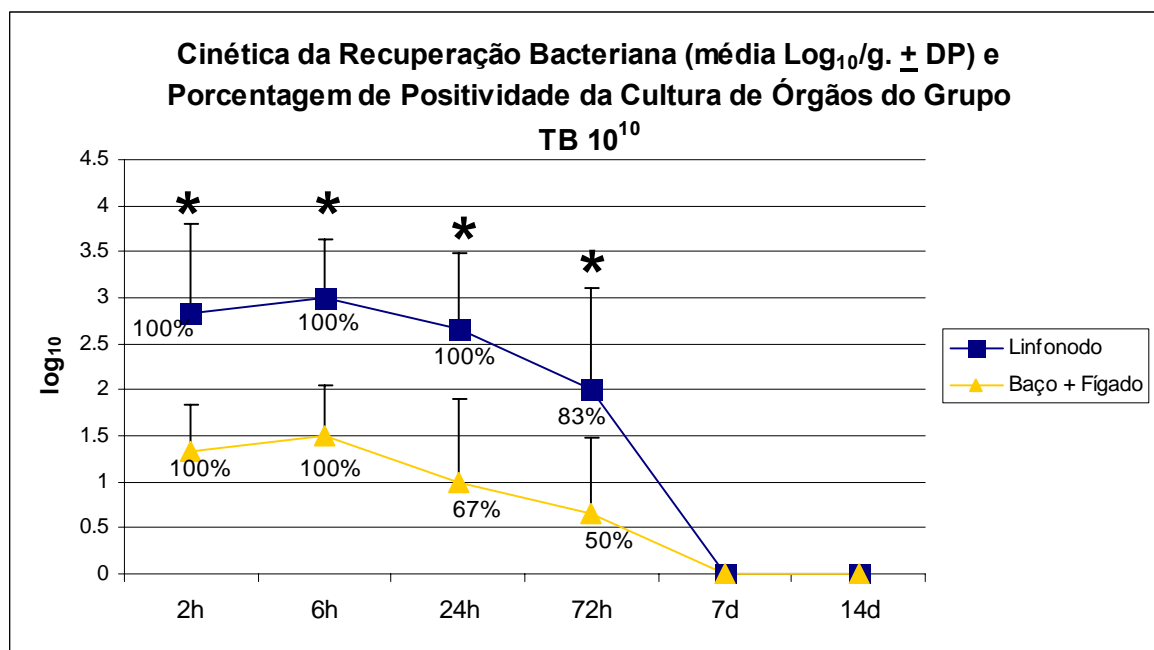
Para comparar uma mesma variável entre grupos de estudo diferentes, utilizou-se o Teste de variância por postos de Kruskal-Wallis.

Em todos os testes estatísticos o nível de significância fixou-se em 5% ou $p \leq 0,05$, sinalizando os valores significantes com asterisco.

3 Resultado

1. ÍNDICE DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.

A recuperação das bactérias translocadas em todos os períodos nos diferentes compartimentos foi expressa percentualmente e quantitativamente. (Figura 6).



2H (LNM vs B+F) $p=0.0143^*$

6H (LNM vs B+F) $p=0.0412^*$

24H (LNM vs B+F) $p=0.0412^*$

72H (LNM vs B+F) $p=0.0412^*$

Figura 6. Cinética da porcentagem de positividade e média quantitativa das bactérias translocadas do grupo TB.

No linfonodo do mesentério observou-se diferença significativa no número de bactérias recuperadas em relação aos demais órgãos, nos períodos de 2 a 72 horas, sendo o pico máximo de recuperação bacteriana com 6 horas. A análise estatística do linfonodo do mesentério nos períodos de 2 a 72 horas não mostrou diferença estatística.

Os órgãos extra-intestinais (baço + fígado) também apresentaram pico de recuperação bacteriana com 6 horas, e não apresentaram diferença estatística entre os períodos de 2 a 72 horas.

O índice de positividade manteve-se 100% (6/6) positivo para os linfonodos do mesentério e para os órgãos baço e fígado até o período de 6 horas. A partir de 24 horas ocorreu decréscimo na recuperação bacteriana nos órgãos, 67% (4/6) e às 72 horas somente 50% dos órgãos (3/6) foram positivos. O mesmo processo foi

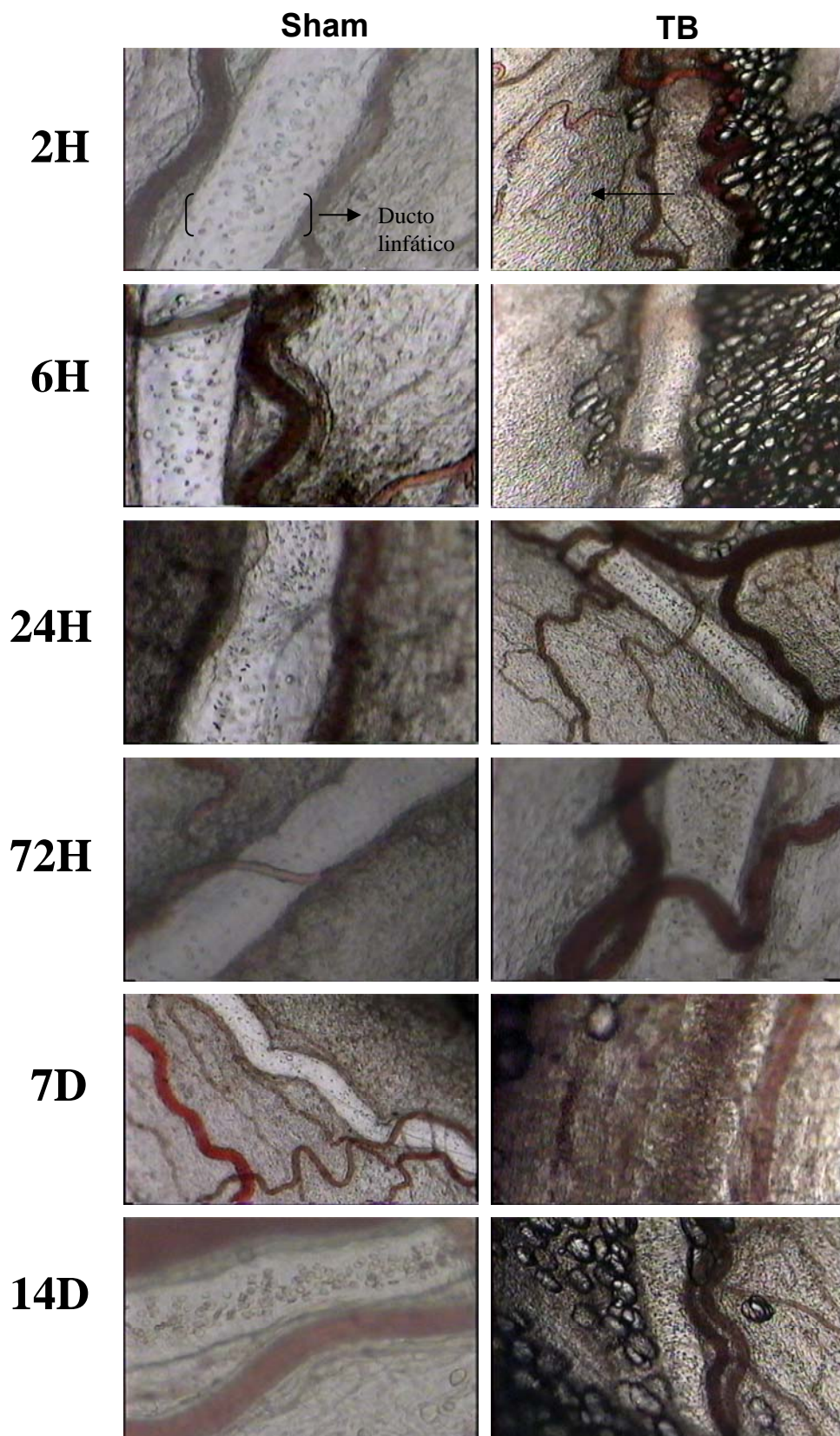
observado nos linfonodos, porém somente com 72 horas, 83% (5/6). Ambos os compartimentos, linfonodo e órgãos se tornaram totalmente negativos com 7 dias.

No grupo Sham não ocorreu recuperação bacteriana em nenhum órgão em todos os períodos estudados.

2. MICROSCOPIA INTRAVITAL

Aspecto da microcirculação linfática do mesentério dos grupos Sham e TB em todos os períodos. (figura 7)

A microscopia intravital dos vasos linfáticos aferentes mesenteriais mostrou um aumento da celularidade em ambos os grupos, fluindo no sentido intestino-LNM. Em todos os períodos avaliados, apesar de variações numéricas sugestivas, relativos aos tempos estudados nos respectivos grupos, foi observado um aparente aumento da celularidade no grupo TB quando comparado ao grupo Sham em todos os períodos. Além disso, apesar de não ter encontrado bactérias viáveis em nenhum compartimento a partir do 7º dia, o contínuo aumento do tráfego celular pela linfa aferente manteve-se presente em todos os períodos do estudo.(figura.7)



Aspecto da microcirculação sanguínea do mesentério dos grupos Sham e TB em todos os períodos. (figura 8)

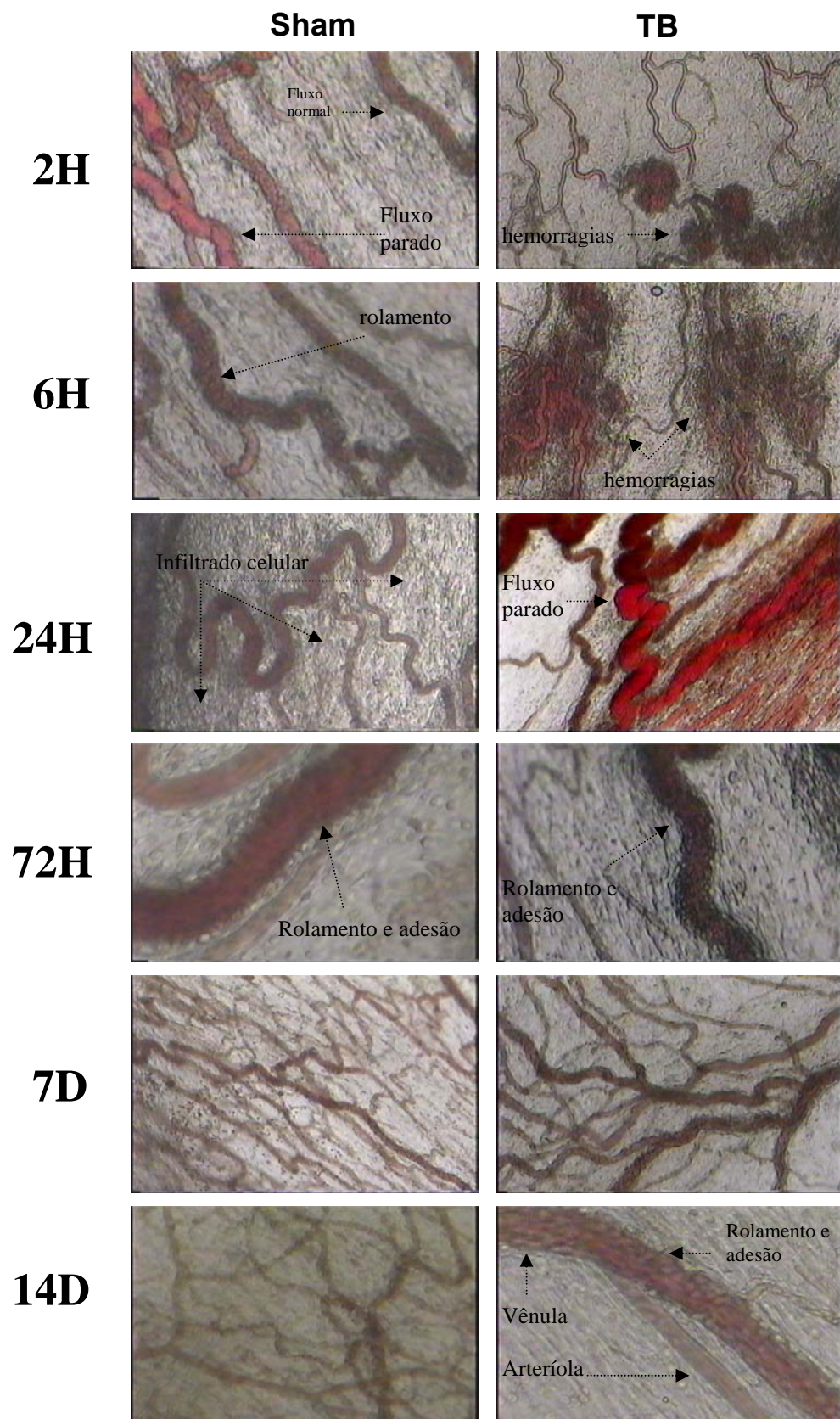
No grupo TB, as lesões vasculares da microcirculação mesenterial foram expressivas a partir de duas horas, sendo mais intensos com 24 horas. A fase de resolução aparente das lesões microcirculatórias foram observadas nos períodos de 7 e 14 dias.

O rolamento dos leucócitos esteve presente durante todos os períodos de estudo em ambos os grupos, sendo mais evidente a sua ocorrência associado a adesão ao endotélio vascular das vênulas no grupo TB. Além disso, nos animais do grupo TB as aderências leucocitárias também foram observadas nas arteríolas, fato este ausente no grupo Sham.

As vênulas e capilares apresentaram fluxo lentificado e ou parado nos dois grupos e em todos os períodos. No grupo TB, esta alteração estava mais difusamente distribuída no período de 24 horas, inclusive com a lentificação de arteríolas e de vênulas de alto fluxo. Estas alterações tornaram-se gradativamente menores ao decorrer do período evolutivo, assemelhando-se a uma microcirculação “normal” no período de 14 dias.

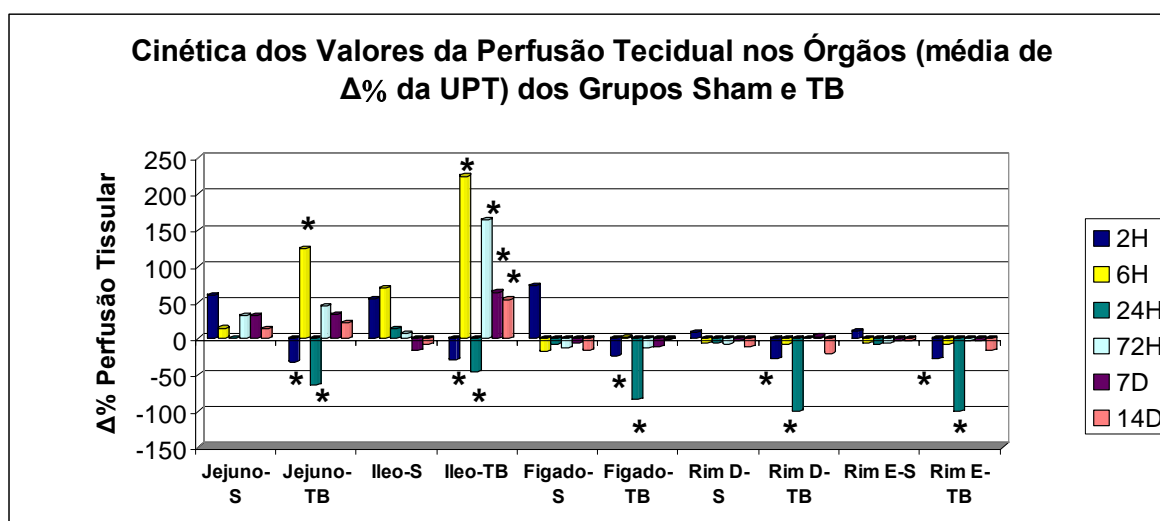
A hemorragia perivascular com infiltrado celular foi observada somente no grupo de TB, sendo a sua expressão máxima com 24 horas, coincidindo com o período de pico da recuperação bacteriana extra-intestinal. A avaliação cinética mostrou que estas lesões foram melhorando com o tempo e no período de 14 dias as hemorragias estavam praticamente ausentes.

Assim, de forma geral, pode-se observar que o fenômeno da TB ocasionou um aumento no tráfego celular dos ductos linfáticos aferentes além de lesões importantes tempo-dependentes e autolimitadas da microcirculação mesenterial.



3. PERFUSÃO TECIDUAL

Os valores da perfusão tecidual dos compartimentos dos grupos Sham e TB de todos os períodos foram expressos em média de $\Delta\%$ da UPT. (Figura 9)



jejuno 2 H (Sham vs TB) p= 0.0039*	jejuno 6H (Sham vs TB) p= 0.0039*	jejuno 24H (Sham vs TB) p= 0.0039*
íleo 2H (Sham vs TB) p= 0.0039*	íleo 6H (Sham vs TB) p= 0.0065*	íleo 24H (Sham vs TB) p= 0.0039*
íleo 72H (Sham vs TB) p= 0.0039*	íleo 7 dias (Sham vs TB) p= 0.0039*	íleo 14 dias (Sham vs TB) p= 0.0104*
fígado 2 H (Sham vs TB) p= 0.0039*	fígado 24H (Sham vs TB) p= 0.0039*	rim D 2 H (Sham vs TB) p= 0.0039*
rim D 24H (Sham vs TB) p= 0.0039*	rim E 2 H (Sham vs TB) p= 0.0039*	rim E 24H (Sham vs TB) p= 0.0039*

Figura 9. Valores médios da perfusão tecidual dos órgãos nos grupos Sham e TB de todos os períodos.

A análise da perfusão de todos os órgãos dos animais do grupo Sham não mostrou alterações significantes, variando entre discreta positividade e negatividade ao longo dos períodos.

No grupo TB, no período de 2 e 24 horas, observou-se redução significativa tanto na perfusão tecidual local (jejuno e íleo) como na sistêmica (fígado e rins), quando comparado ao grupo Sham. No período de 6 horas o compartimento intestinal (jejuno e íleo) apresentou aumento da perfusão tecidual estatisticamente significativa, entretanto nos períodos de 72 horas, 7 e 14 dias, somente no íleo foi observado um aumento significativo da perfusão.

A partir do período 72 horas, nos órgãos sistêmicos, observou-se uma tendência à normalização, com valores da perfusão tornando-se próximos aos valores basais.

4. LEUCOGRAMA DO SANGUE

O número de células do leucograma sanguíneo dos grupos Sham e TB nos períodos 2, 6, 24, 72 horas e 14 dias estão expressos em mil células/mm³. (Figura 10).

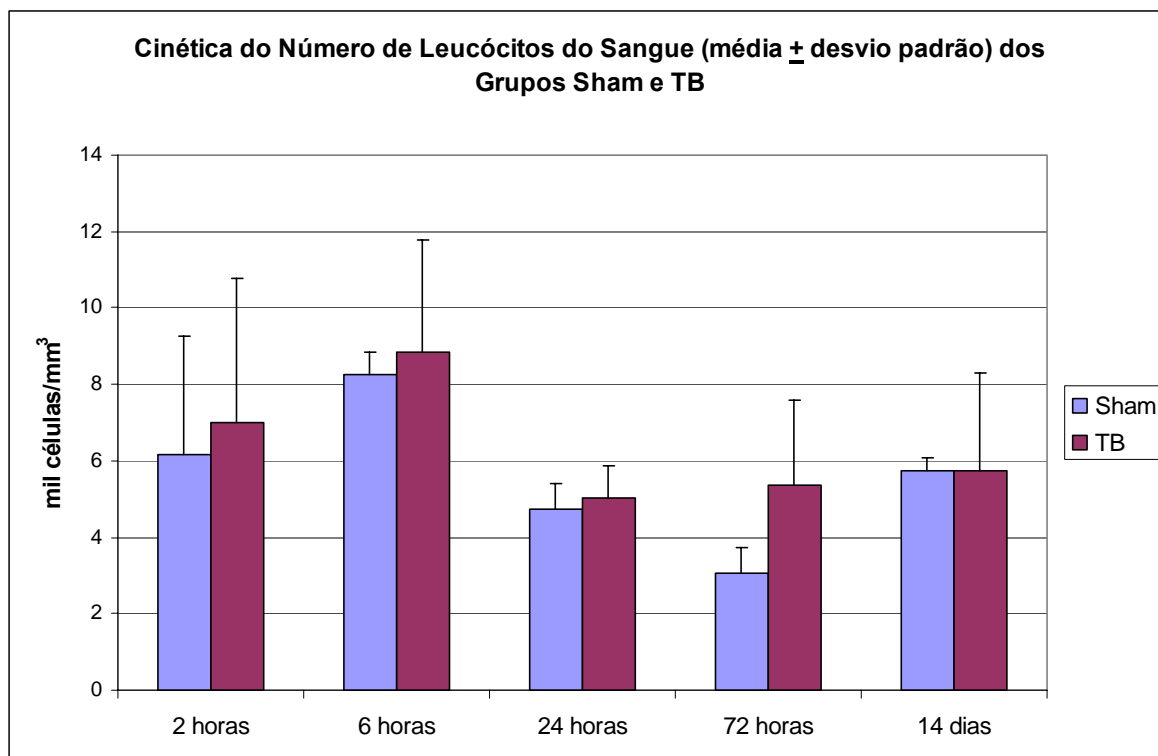
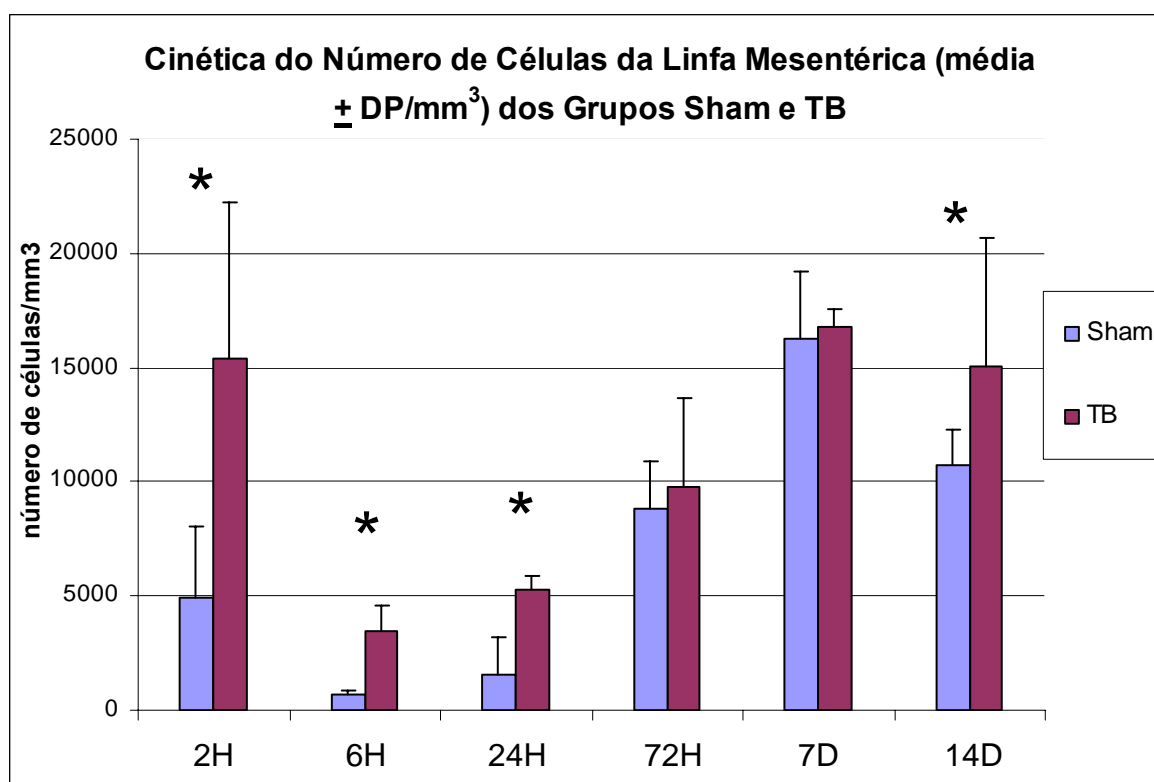


Figura 10. Cinética da média dos leucócitos do sangue nos grupos Sham e TB.

A análise estatística do número de leucócitos do sangue não mostrou diferença significativa entre os grupos Sham e TB nos períodos estudados.

5. LINFOGRAMA

O número das células da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB de todos os períodos estão expressos em células/mm³. (Figura 11).



2 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0374^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039^*$

14 dias (Sham vs TB) $p = 0.0374^*$

Figura 11. Número total das células da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB de todos os períodos.

Em ambos os grupos (Sham e TB) observou-se uma variação numérica das células da linfa mesentérica eferente relativas aos períodos de estudo. No entanto o grupo TB mostrou maior número de células em todos os períodos, sendo significativo com 2, 6, 24 horas e 14 dias. Apesar desta diferença ambos os grupos apresentaram uma redução numérica abrupta no período de 6 horas, seguido de um aumento progressivo até o período de 7 dias. Entre o período 7 e 14 dias observou-se uma nova redução numérica das células.

6. CITOMETRIA DE FLUXO

As figuras (12 a 21) mostram a porcentagem das subpopulações de linfócitos da linfa mesentérica dos grupos Sham e TB em todos os períodos do estudo.

Figura 12

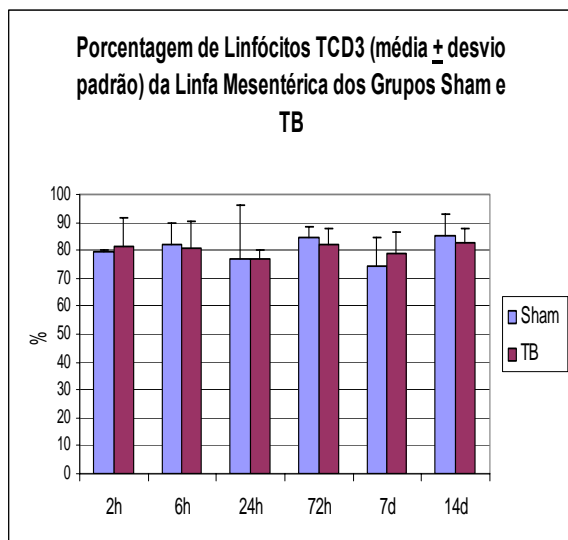


Figura 13

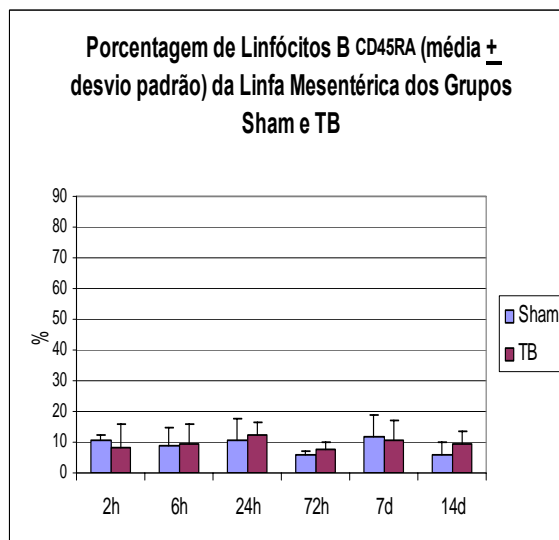


Figura 12. Porcentagem dos linfócitos T ($CD3^+$) na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

Figura 13. Porcentagem dos linfócitos B ($CD45RA^+$) na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

A análise das figuras 12 e 13 mostrou o predomínio dos linfócitos T na linfa mesentérica eferente, correspondendo a cerca de 83% das células, enquanto que os linfócitos B corresponderam a cerca de 12%, proporção observada em ambos os grupos, Sham e TB, durante todos os períodos analisados. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

Figura 14

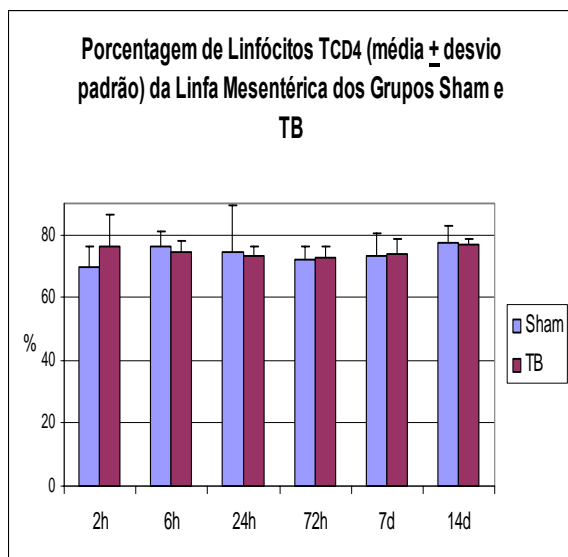


Figura 15

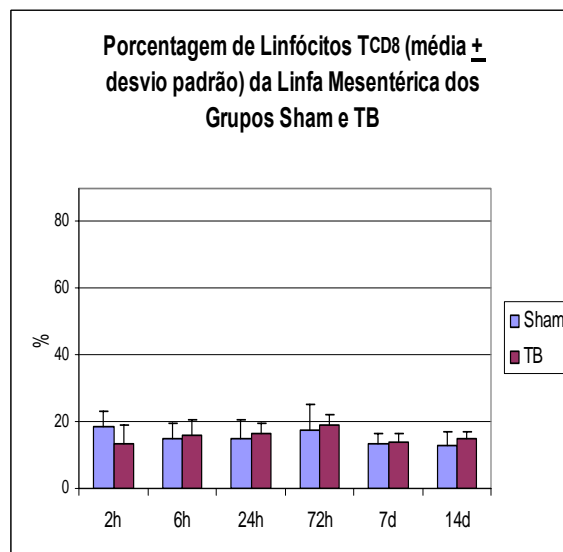


Figura 14. Porcentagem dos linfócitos Tauxiliar ($CD4^+$) na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

Figura 15. Porcentagem dos linfócitos Tcitotóxico ($CD8^+$) na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 14 e 15 mostraram que as subpopulações de linfócito Tauxiliar e linfócito Tcitotóxico representaram cerca de 75% e 15% respectivamente da população total dos linfócitos T da linfa mesentérica eferente em ambos os grupos e em todos os períodos de estudo. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

Figura 16

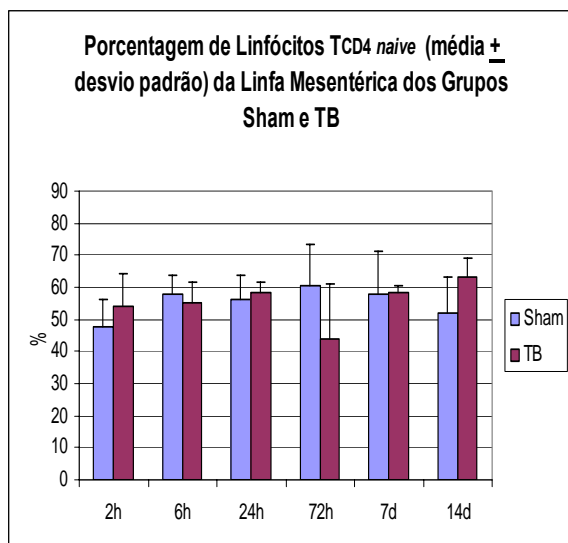


Figura 17

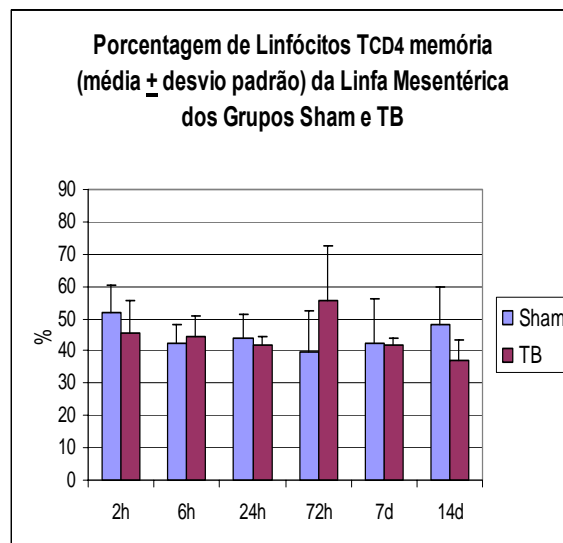


Figura 16. Porcentagem dos linfócitos Tauxiliar *naive* na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

Figura 17. Porcentagem dos linfócitos Tauxiliar memória na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 16 e 17 mostraram que o percentual da população dos linfócitos Tauxiliar *naive* e Tauxiliar memória foram de 55% e 45% respectivamente, em ambos os grupos e em todos os períodos. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

Figura 18

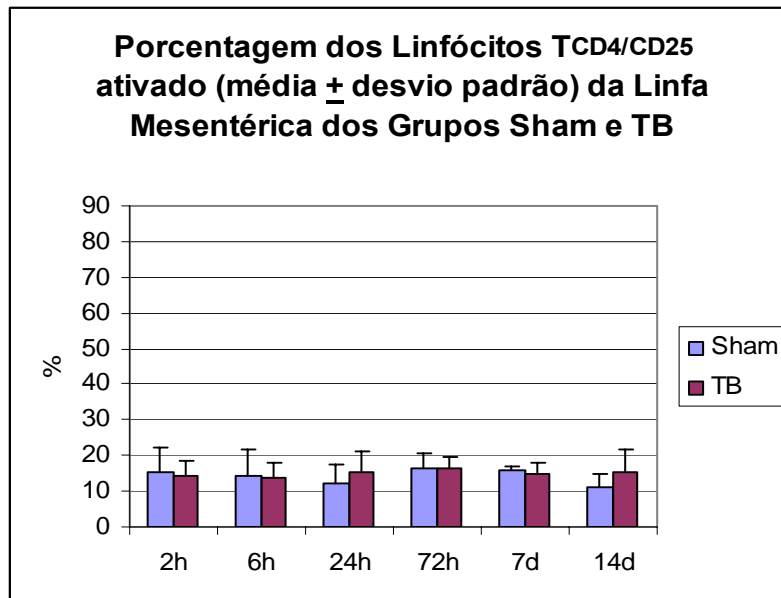


Figura 18. Porcentagem dos linfócitos Tauxiliar ativado (CD4/CD25⁺) na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

A figura 18 mostrou que os linfócitos Tauxiliares ativados representaram cerca de 15% da população total de linfócitos Tauxiliares. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

Figura 19

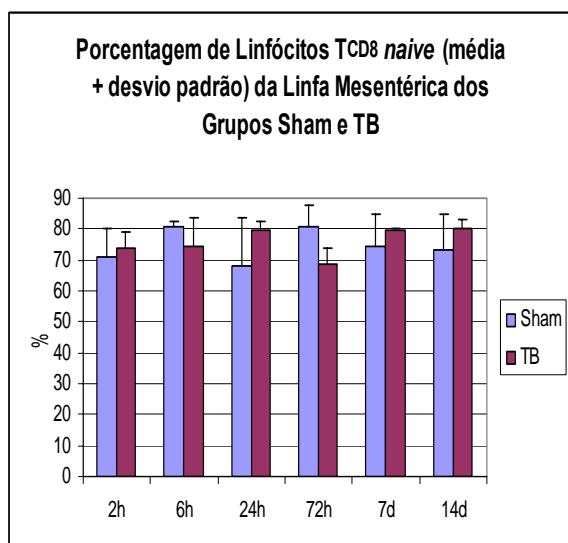


Figura 20

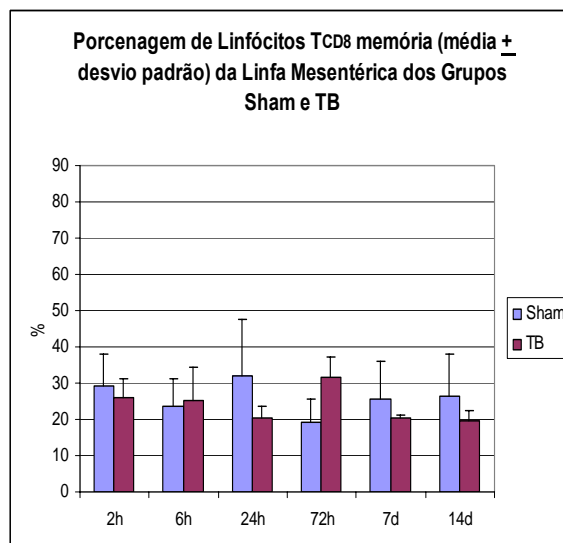
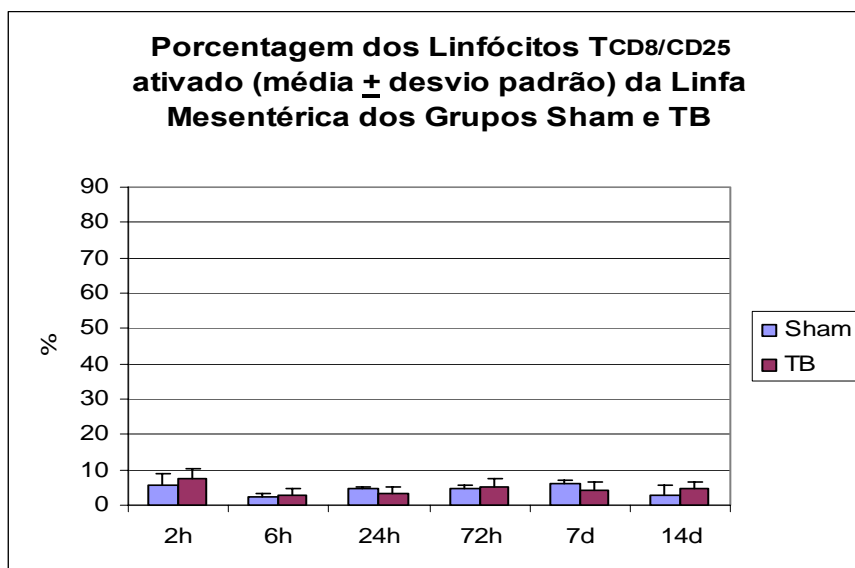


Figura 19. Porcentagem dos linfócitos Tcitotóxico *naïve* na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

Figura 20. Porcentagem dos linfócitos Tcitotóxico memória na linfa mesentérica eferente nos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 19 e 20 mostraram que o percentual da população dos linfócitos Tcitotóxico *naïve* e Tcitotóxico memória foram de 75% e 25% respectivamente, em ambos os grupos e em todos os períodos. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

Figura 21



A figura 21 mostrou que os linfócitos Tcitotóxicos ativados representaram cerca de 5% da população total de linfócitos Tcitotóxicos. Não houve diferença estatística entre os grupos em todos os períodos estudados.

7- Correlação entre citometria e linfograma

Baseado nos resultados do linfograma, onde o grupo TB mostrou uma superioridade numérica em todos os períodos quando comparados aos do grupo Sham (Figura. 11), procedeu-se a conversão do percentual dos achados da citometria dos linfócitos e de suas subpopulações de ambos os grupos (Figuras.12 a 21) em valores numéricos proporcionais, os quais foram representados nas figuras.22 a 45.

Figura 22

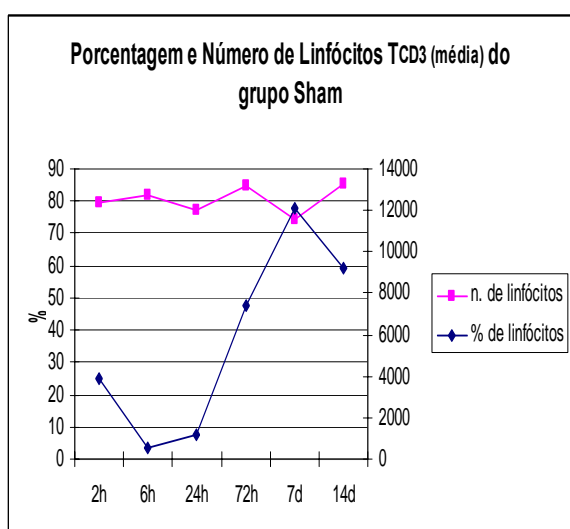
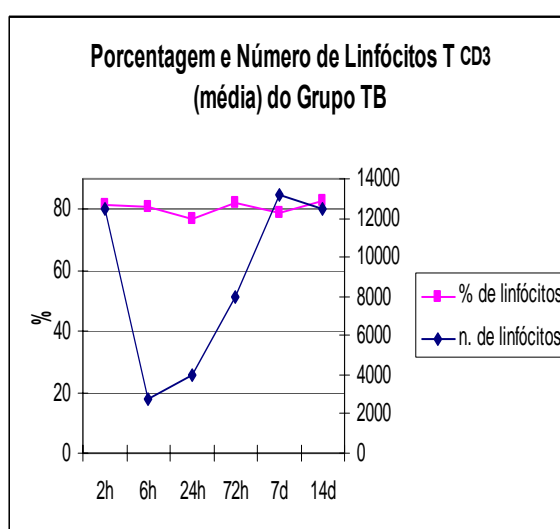


Figura 23



Figuras 22 e 23. Número total de linfócitos T proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 22 e 23 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T ($CD3^+$) tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 24

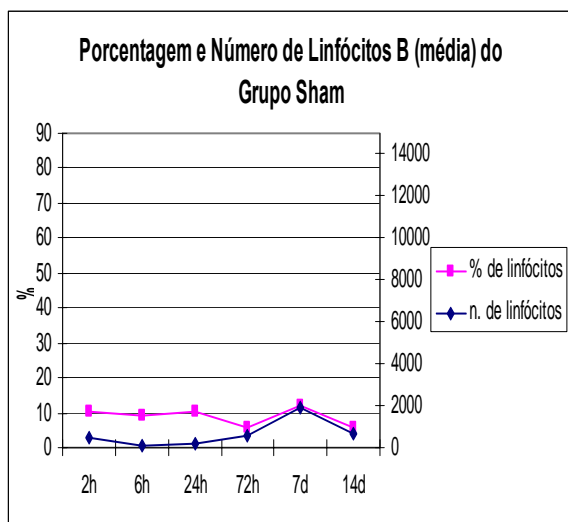
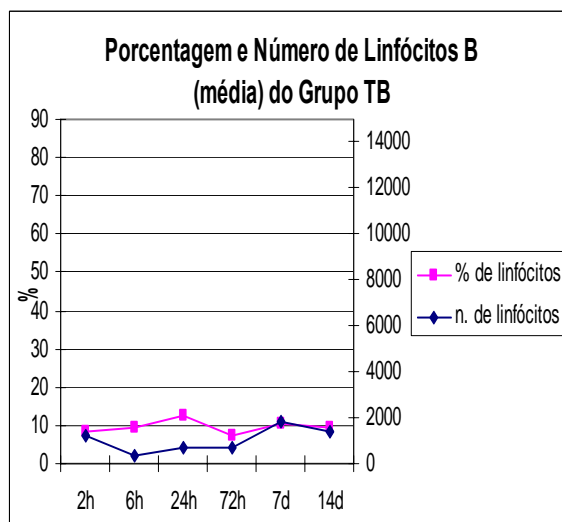


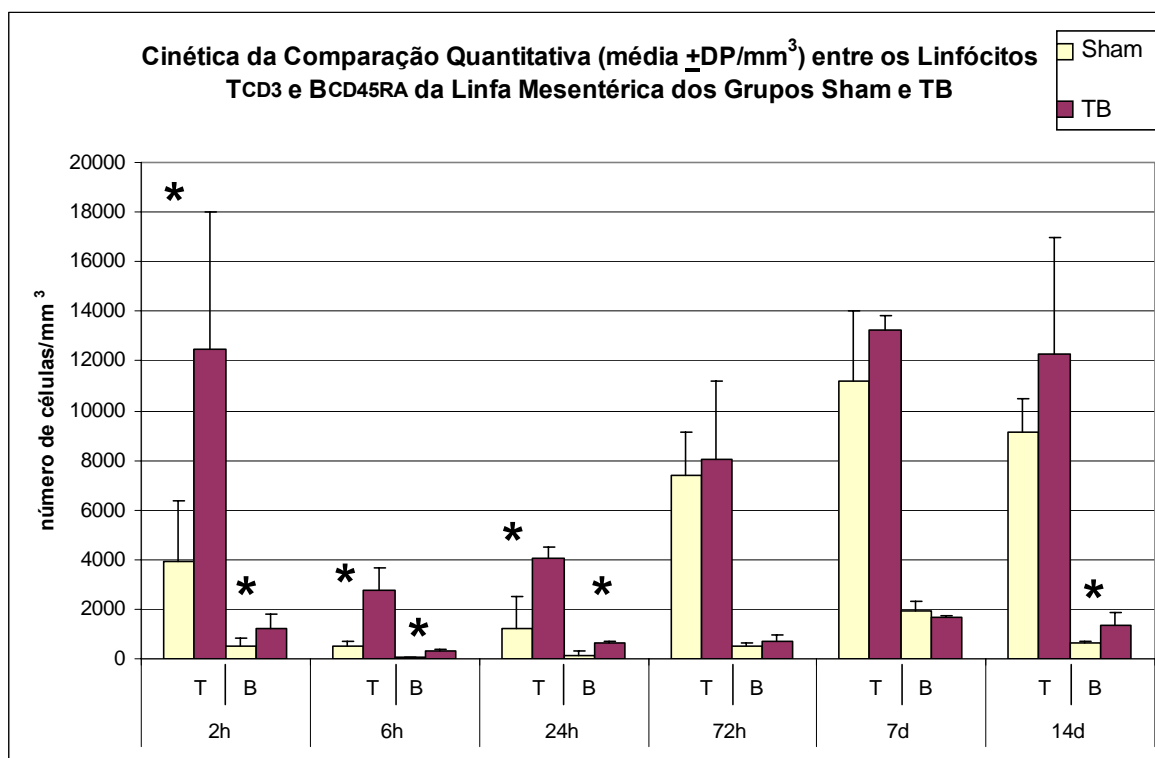
Figura 25



Figuras 24 e 25. Número total de linfócitos B proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 24 e 25 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos B (CD45RA⁺) tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Comparação quantitativa dos números proporcionais de linfócitos T e B nos grupos Sham e TB de todos os períodos. Foram agrupadas na figura 26.



Linfócitos T:

2 Horas (Sham vs TB) $p = 0.025$

6 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039$

24 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039$

Linfócitos B:

2 Horas (Sham vs TB) $p = 0.037$

6 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039$

24 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039$

14 dias (Sham vs TB) $p = 0.0039$

Figura 26. Número proporcional de linfócitos T e B dos grupos Sham e TB de todos os períodos.

A análise estatística do número proporcional de linfócitos T mostrou um aumento significativo nos períodos de 2, 6 e 24 horas do grupo TB comparado ao grupo Sham. Semelhantemente aos achados dos linfócitos T, os linfócitos B apresentaram aumento significativo nos períodos de 2, 6, 24 horas e 14 dias no grupo TB comparado ao grupo Sham.

Figura 27

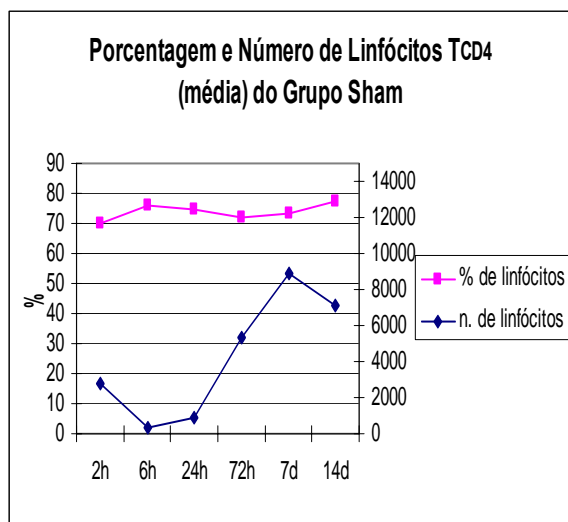
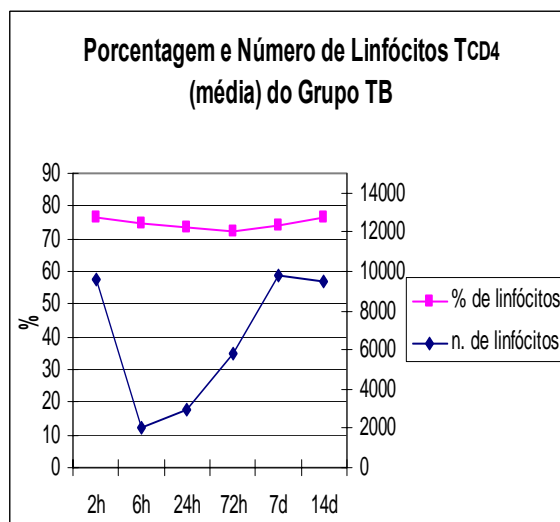


Figura 28



Figuras 27 e 28. Número total de linfócitos Tauxiliares ($CD4^+$) proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 27 e 28 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos Tauxiliar tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 29

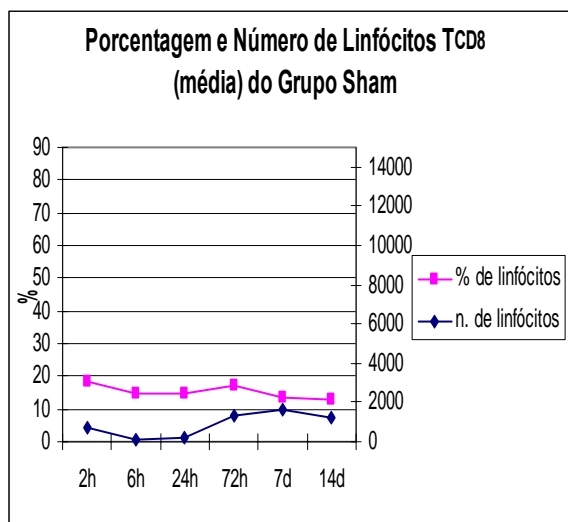
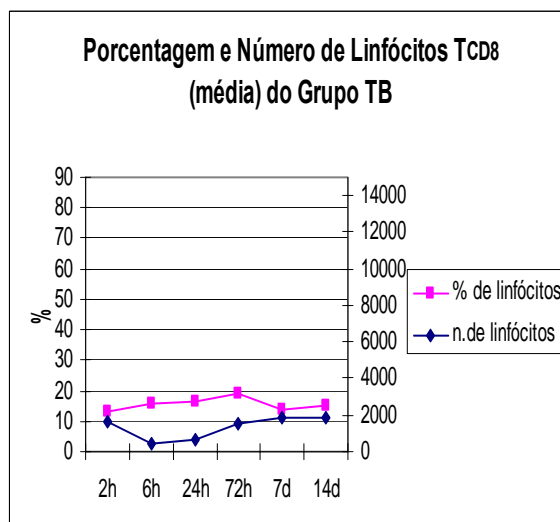


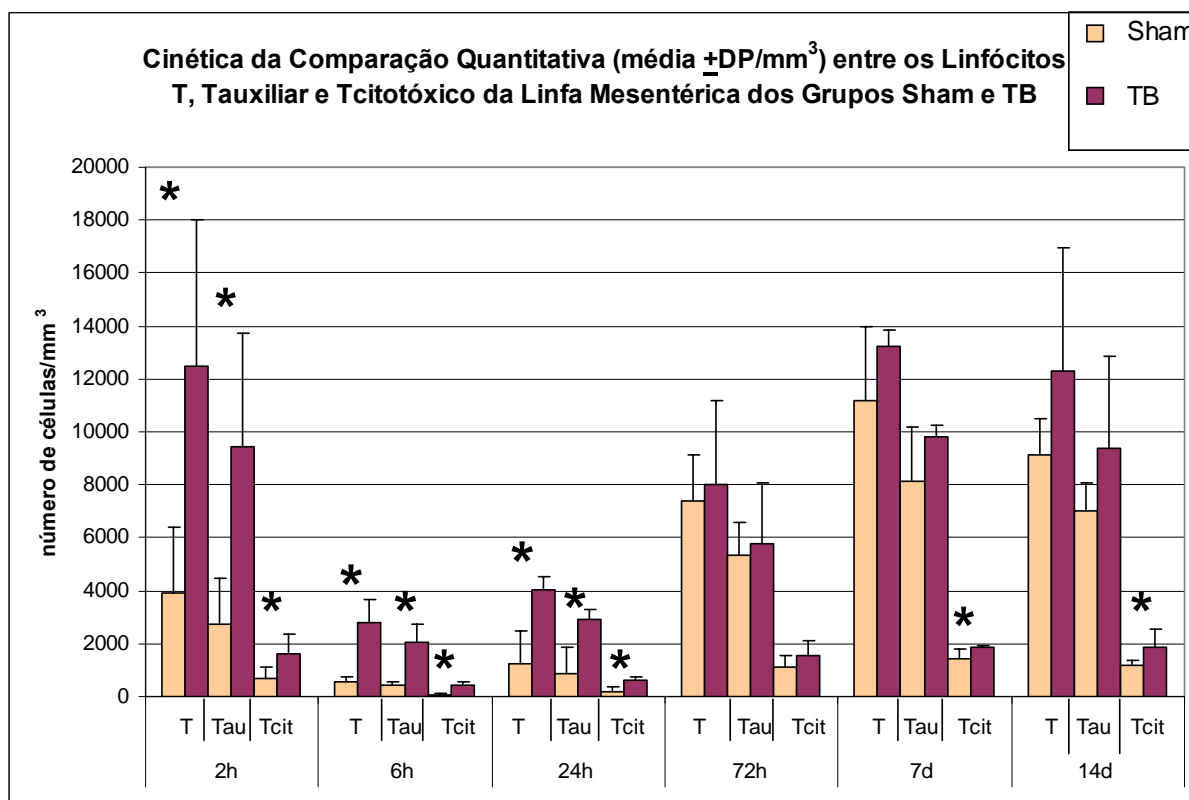
Figura 30



Figuras 29 e 30. Número total de linfócitos T citotóxico ($CD8^+$) proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 29 e 30 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T citotóxico tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Comparação quantitativa dos números proporcionais de linfócitos T e linfócitos Tauxiliar e citotóxico nos grupos Sham e TB de todos os períodos.



Linfócitos Tauxiliares:

2 Horas (Sham vs TB) $p=0.025^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

Linfócitos Tcitotóxicos:

2 Horas (Sham vs TB) $p=0.037^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

7 dias (Sham vs TB) $p=0.037^*$

14 dias (Sham vs TB) $p=0.016^*$

Figura 31. Número proporcional de linfócitos Tauxiliar (Tau) e citotóxico (Tcit) dos grupos Sham e TB de todos os períodos.

A análise estatística do número proporcional de linfócitos Tauxiliar mostrou um aumento significativo nos períodos de 2, 6 e 24 horas do grupo TB comparado ao grupo Sham. Semelhantemente os linfócitos Tcitotóxico apresentaram aumento significativo nos períodos de 2, 6, 24 horas, 7 e 14 dias no grupo TB comparado ao grupo Sham.

Figura 32

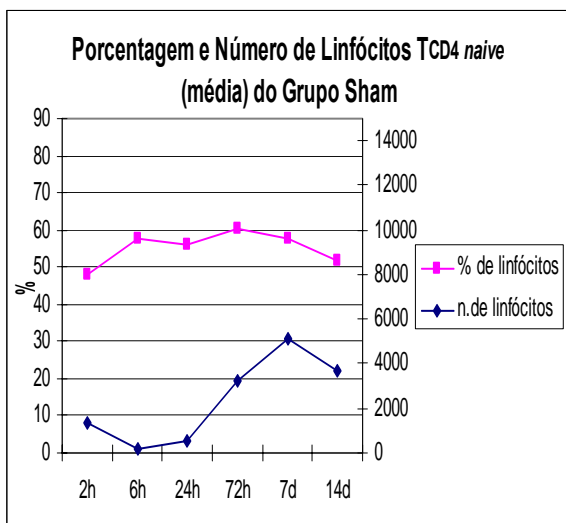
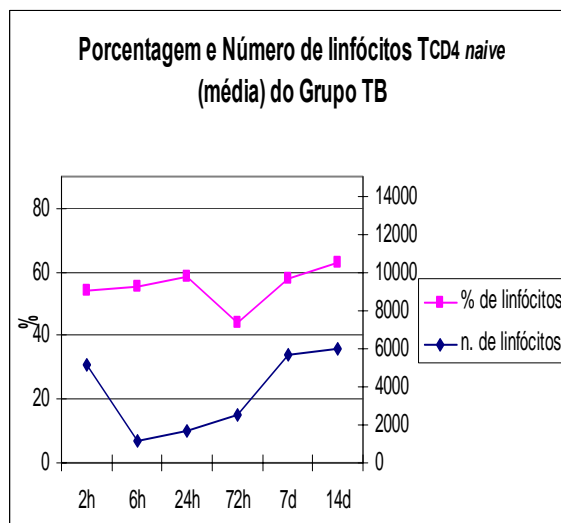


Figura 33



Figuras 32 e 33. Número total de linfócitos Tauxiliar *naive* proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 32 e 33 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T auxiliar *naive* tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 34

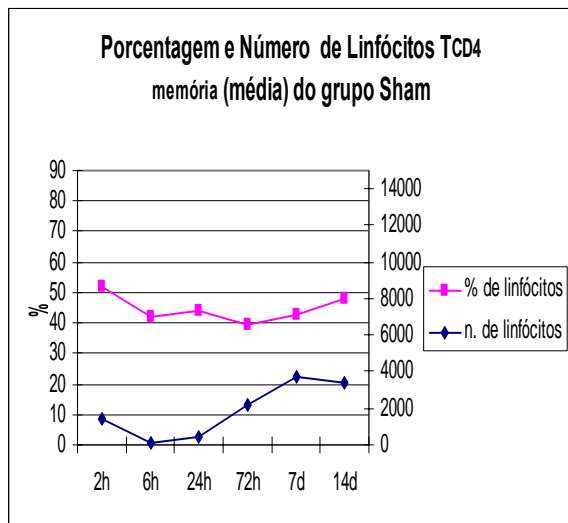
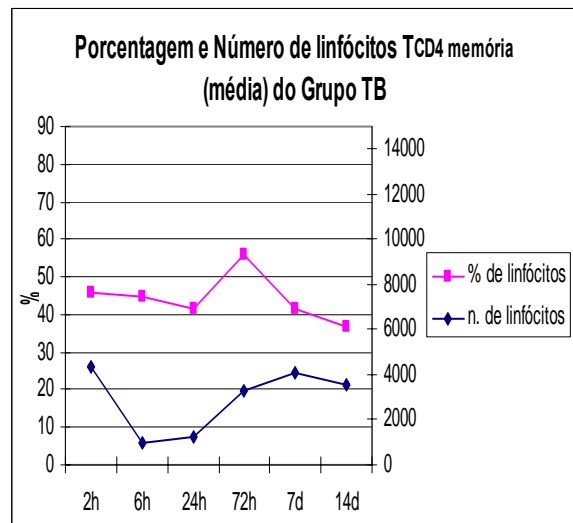


Figura 35



Figuras 34 e 35. Número total de linfócitos Tcitotóxico memória proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 34 e 35 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos Tcitotóxico memória tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 36

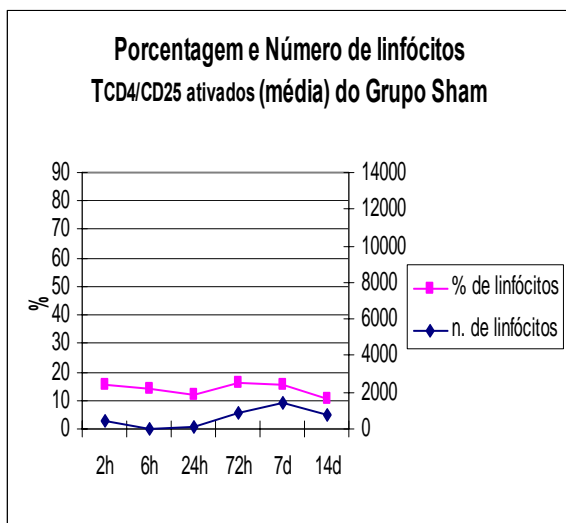
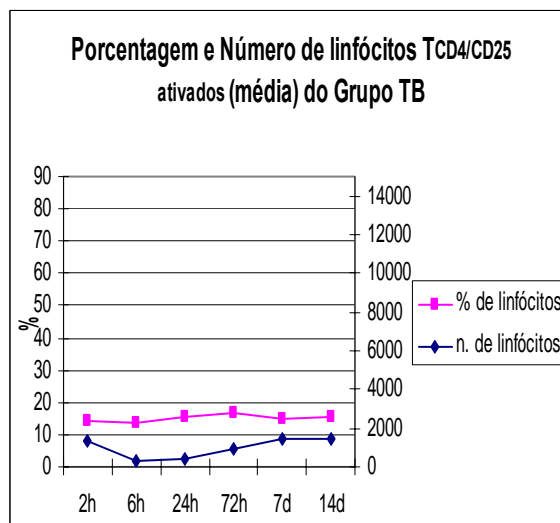


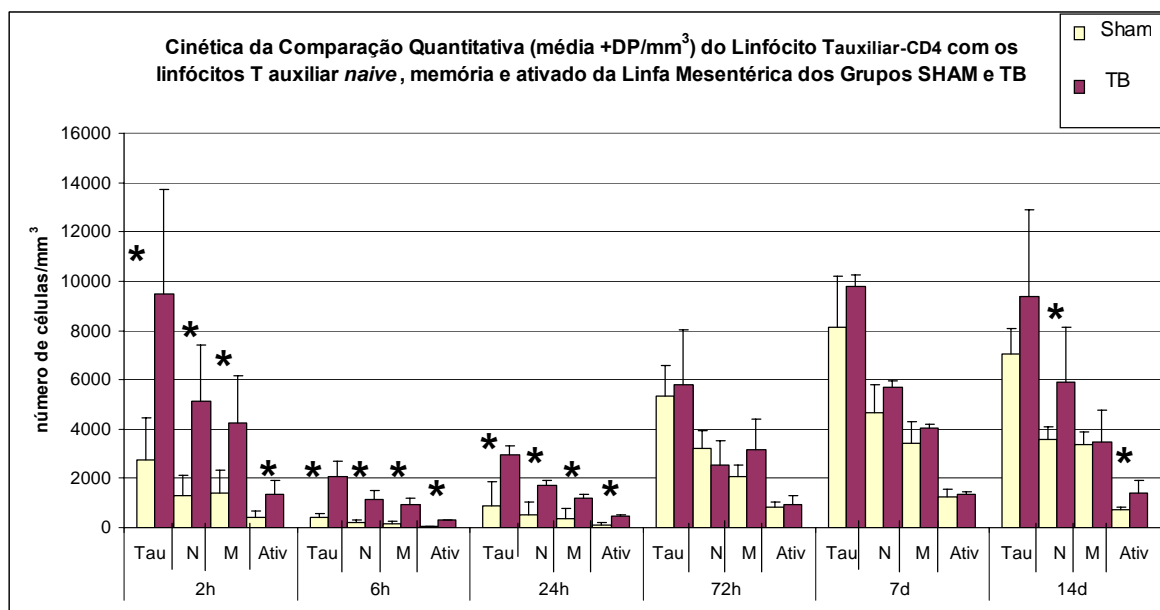
Figura 37



Figuras 36 e 37. Número total de linfócitos Tauxiliares ativados proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 36 e 37 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos Tauxiliar ativado tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Comparação quantitativa dos números proporcionais de linfócitos Tauxiliar e linfócitos Tauxiliar *naive*, memória e ativado nos grupos Sham e TB de todos os períodos.



Linfócitos T auxiliares *naive*:

2 Horas (Sham vs TB) $p=0.0163^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

14 dias (Sham vs TB) $p=0.0065^*$

Linfócitos T auxiliares memória:

2 Horas (Sham vs TB) $p=0.0374^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p=0.0065^*$

Linfócitos T auxiliares ativados:

2 Horas (Sham vs TB) $p=0.025^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

14 dias (Sham vs TB) $p=0.0039^*$

Figura 38. Número proporcional de linfócitos Tauxiliar (Tau) e linfócitos T auxiliar *naive* (N), memória (M) e ativado (Ativ) dos grupos Sham e TB de todos os períodos.

A análise estatística do número proporcional de linfócitos Tauxiliar *naive* mostrou um aumento significativo nos períodos de 2, 6, 24 horas e 14 dias do grupo TB comparado ao grupo Sham. Semelhantemente aos achados dos linfócitos Tauxiliar *naive*, os linfócitos Tauxiliar memória apresentaram aumento significativo nos períodos de 2, 6 e 24 horas no grupo TB comparado ao grupo Sham. O linfócito Tauxiliar ativado mostrou um aumento significativo nos períodos de 2, 6, 24 horas e 14 dias.

Figura 39

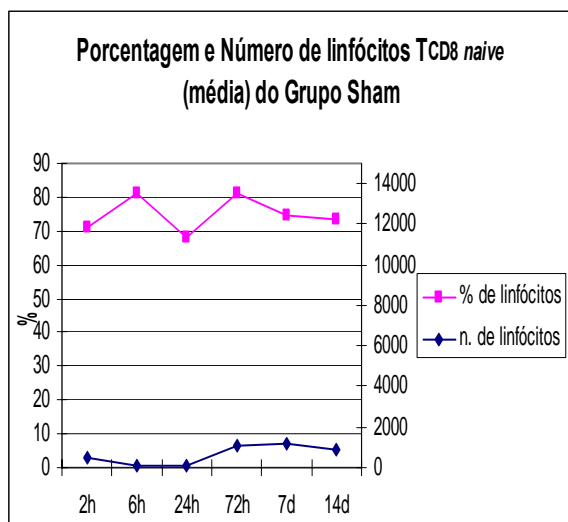
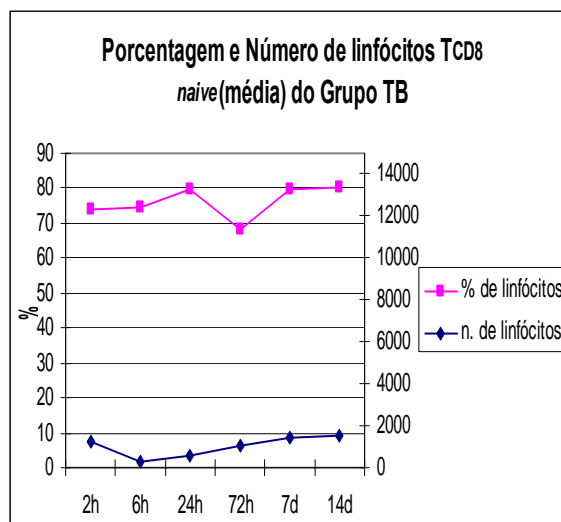


Figura 40



Figuras 39 e 40. Número total de linfócitos Tcitotóxico *naive* proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 39 e 40 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T citotóxico *naive* tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 41

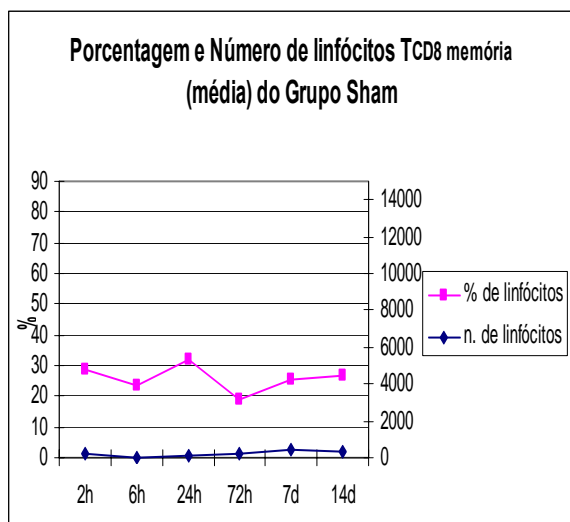
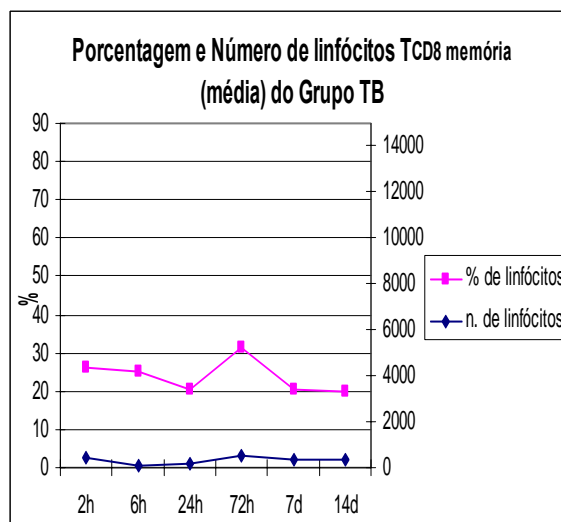


Figura 42



Figuras 41 e 42. Número total de linfócitos T citotóxico memória proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 41 e 42 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T citotóxico memória tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Figura 43

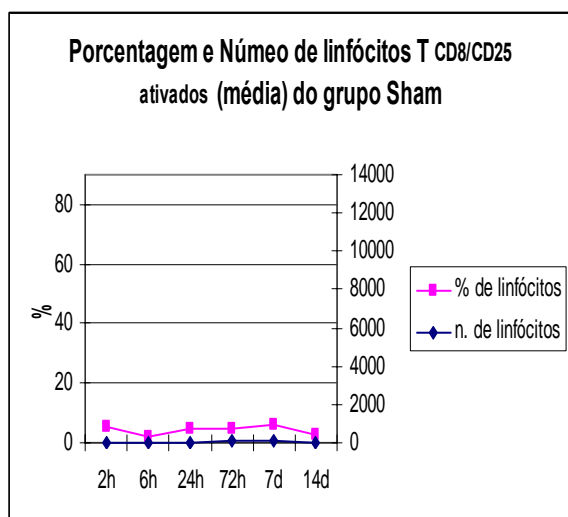
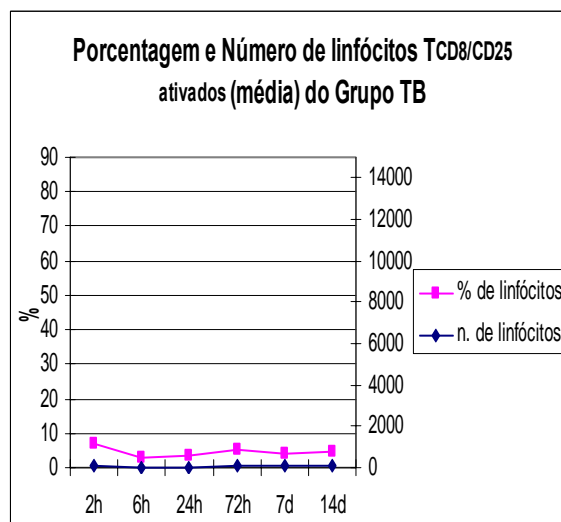


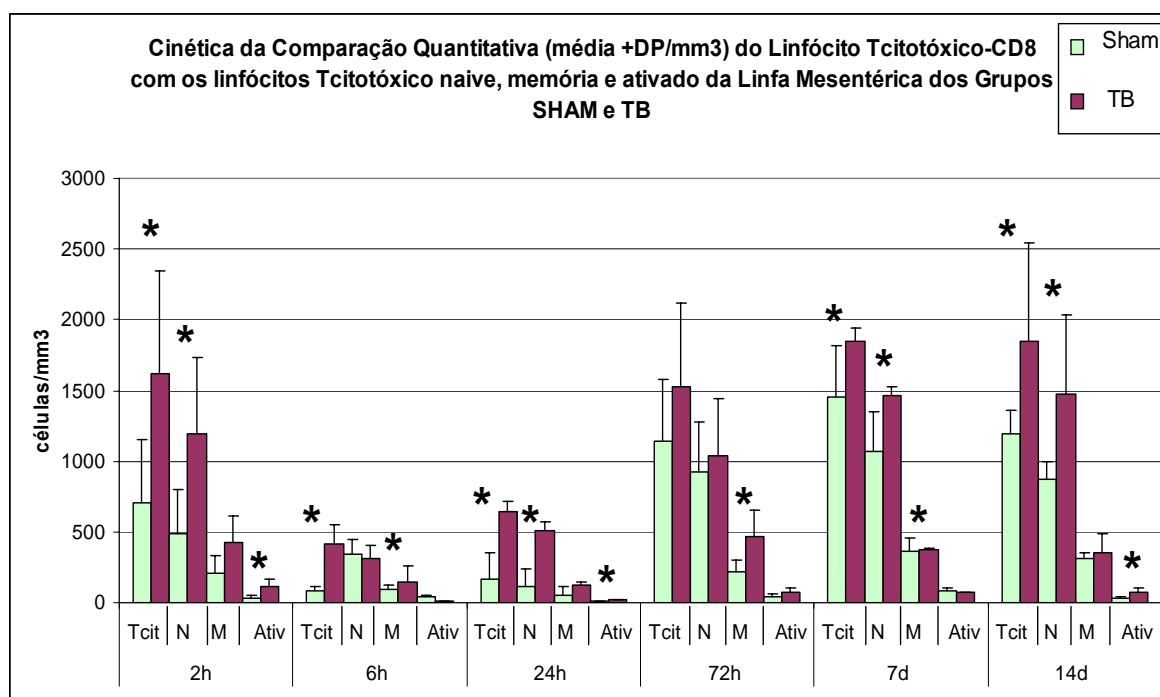
Figura 44



Figuras 43 e 44. Número total de linfócitos T citotóxico ativados proporcional à porcentagem de linfócitos T da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

As figuras 43 e 44 mostraram que embora a porcentagem dos linfócitos T citotóxico ativados tenha permanecido semelhante ao longo dos períodos estudados, o número proporcional de células drenadas pelo ducto linfático eferente apresentou diferenças em ambos grupos Sham e TB.

Comparação quantitativa dos números proporcionais de linfócitos T e linfócitos Tcitotóxicos naíve, memória e ativado nos grupos Sham e TB de todos os períodos.



Linfócitos T citotóxicos Naíve:

2 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0374^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0039^*$

7 dias (Sham vs TB) $p = 0.0163^*$

14 dias (Sham vs TB) $p = 0.0065^*$

Linfócitos T citotóxicos memória

6 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0065^*$

72 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0163^*$

7 dias (Sham vs TB) $p = 0.0039^*$

Linfócitos T citotóxicos ativados:

2 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0306^*$

6 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0051^*$

24 Horas (Sham vs TB) $p = 0.0202^*$

14 dias (Sham vs TB) $p = 0.0039^*$

Figura 45. Número proporcional de linfócitos Tcitotóxicos e linfócitos T citotóxicos *naíve* (N), memória (M) e ativados (Ativ) dos grupos Sham e TB de todos os períodos.

A análise estatística do número proporcional de linfócitos Tcitotóxicos (Tcit), mostrou que os linfócitos Tcitotóxicos *naíve* apresentaram um aumento significativo nos períodos de 2, 24 horas, 7 e 14 dias no grupo TB comparado ao grupo Sham. Semelhantemente aos achados dos linfócitos Tcitotóxico *naíve*, os linfócitos Tcitotóxico memória apresentaram aumento significativo nos períodos de 6, 72 horas e 7 dias no grupo TB comparado ao grupo Sham. O linfócito Tcitotóxico ativado mostrou um aumento significativo nos períodos de 2, 6, 24 horas e 14 dias.

7. CBA-Flex

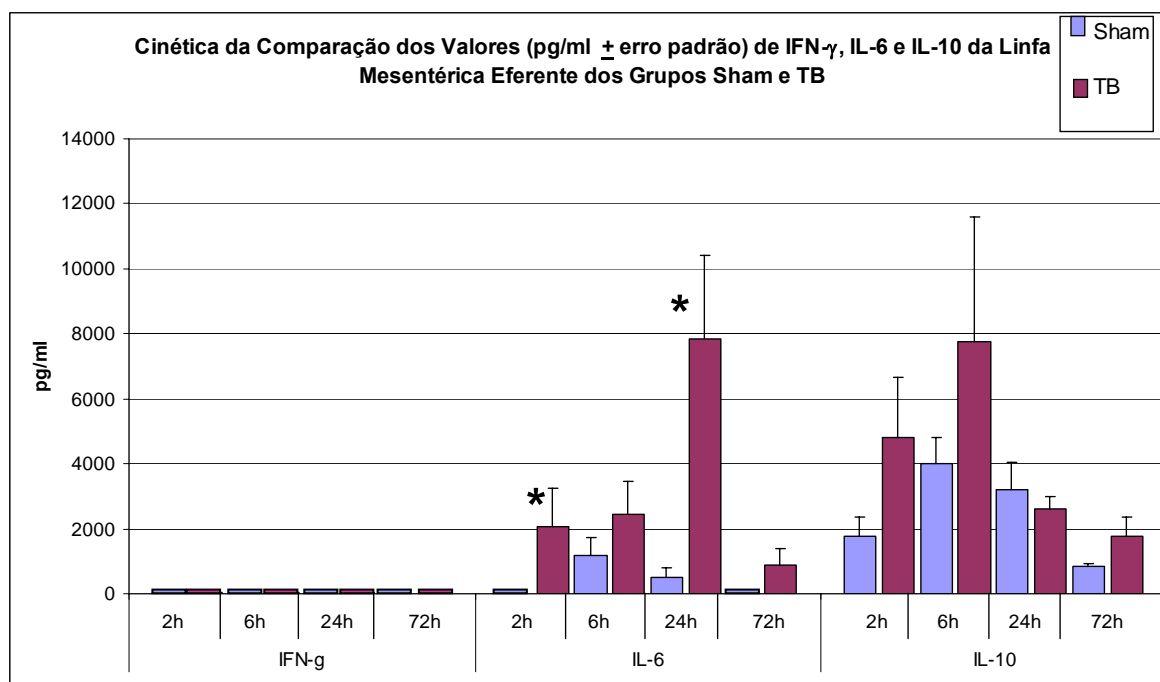
Valores da concentração na linfa mesentérica eferente de INF- γ , IL-6 e IL-10 dos grupos Sham e TB em todos os períodos.

Cinética dos Valores de INF- γ , IL-6 e IL-10 da Linfa Mesentérica Eferente dos Grupos Sham e TB				
Grupo	n	INF-Gama	IL-6	IL-10
Sham 2h	5	22.4 \pm 24.3	0 \pm 0	1780.5 \pm 1298.7
TB 2h	9	24.0 \pm 25.3	2056.8 \pm 3632.7	4813.7 \pm 5583.1
valor de p		0.9468	0.0196 #	0.1615
Sham 6h	6	81.2 \pm 52.1	1187.2 \pm 1319.0	3985.2 \pm 2019.2
TB 6h	8	34.0 \pm 13.8	2451.1 \pm 2845.8	7756.7 \pm 10853.1
valor de p		0.0933	0.2453	0.8973
Sham 24h	5	39.5 \pm 45.9	498.0 \pm 655.3	3216.7 \pm 1891.5
TB 24h	7	47.7 \pm 48.7	7828.3 \pm 6863.6	2604.3 \pm 1040.4
valor de p		0.8075	0.0118 #	0.9353
Sham 72h	5	20.5 \pm 28.8	0 \pm 0	851 \pm 217.8
TB 72h	9	38.2 \pm 35.2	869.6 \pm 1580.4	1768.1 \pm 1762.9
valor de p		0.4634	0.0956	0.3173

Resultados apresentados com as médias \pm desvio padrão pg/ml. n= número de ratos por grupo.
 # p <0.05 refere-se à comparação entre os grupos Sham e TB em horários idênticos.
 O valor "0" corresponde abaixo do limite de detecção.

Tabela 3. Concentrações das citocinas INF- γ , IL-6 e IL-10, na linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas.

Comparação das concentrações de INF- γ , IL-6 e IL-10 da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas. (Figura 46).



2 horas (Sham vs TB) p 0.0208 *

24 horas (Sham vs TB) p 0.021*

Figura 46. Concentração de INF- γ , IL-6 e IL-10 da linfa mesentérica eferente dos grupos Sham e TB nos períodos de 2, 6, 24 e 72 horas.

A expressão de INF- γ na linfa mesentérica eferente permaneceu em baixos níveis independente da presença ou ausência de translocação bacteriana e sem diferença significativa entre os grupos em todos os períodos.

A análise da citocina IL-6 mostrou um aumento de concentração no grupo TB em relação ao grupo Sham em todos os períodos estudados, sendo significativa nos períodos de 2 e 24 horas. Observou-se também que ao longo dos períodos, no grupo TB, houve aumento da concentração, com pico em 24 horas, retornando a níveis menores que 2 horas no período 72 horas. No grupo Sham a baixa expressão desta citocina foi detectada somente nos períodos de 6 e 24 horas.

A análise da citocina IL-10 mostrou maior concentração no grupo TB em relação ao grupo Sham nos períodos 2, 6 e 72 horas, sendo a diferença não significativa entre os grupos. Observou-se também que ao longo do período estudado, no grupo TB, esta citocina alcançou níveis mais elevados em 6 horas, seguida de queda nos períodos subseqüentes, fato que ocorreu de forma similar com o grupo Sham.

4 Discussão

Estudos clínicos e experimentais vêm reiterando o conceito de ser o intestino o órgão iniciador da sepse e de que a passagem de bactérias e ou de seus produtos da luz intestinal, para sítios extra-intestinais, por meio da TB, possa constituir um mecanismo importante no agravamento do estado dos pacientes gravemente enfermos ^{21,95}.

A TB foi definida como sendo a passagem de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para os linfonodos do mesentério (LNM) e para outros sítios extra-intestinais, tais como: baço, fígado, rins, cavidade peritoneal e circulação sangüínea. Segundo a literatura, existem duas vias para as bactérias do intestino alcançarem a circulação sistêmica: a via portal (hematogênica) e a via linfática.

A via linfática tem sido referida pela literatura como a principal via de TB, justificada pela presença constante de bactérias viáveis no linfonodo do mesentério e pela ausência de bactérias no sangue circulante ^{12, 13}. Entretanto os estudos relacionados à recuperação de bactérias translocadas pela linfa eferente, ou seja, pós linfonodo do mesentério, mostraram que a linfa é de rotina estéril, estando positiva somente em condições extremas de sobrecrecimento bacteriano intestinal, o que contesta o conceito de que a via linfática seria a principal via de TB ^{16,19,74,96}.

Diante da presença constante de bactéria viáveis no LNM e da ausência de bactérias viáveis na linfa mesentérica eferente, foram aventadas considerações sobre qual seria o papel da linfa eferente durante o processo de TB dentro do contexto geral da infecção.

Neste trabalho, na tentativa de melhor compreender o fenômeno da TB, foi utilizado o modelo descrito por Koh e Silva¹⁰ (1996), para avaliar seus efeitos, tanto sistêmicos quanto locais, ao longo de uma cinética de estudo após um único episódio de TB incluindo a avaliação da via linfática neste processo.

Quando a recuperação bacteriana foi analisada nos compartimentos sistêmicos e locais, observou-se, no grupo TB, que até as primeiras 6 horas ocorreu 100% de positividade, em todos os animais, tanto nos LNM quanto nos órgãos sistêmicos (baco e fígado). No período de 24 horas observou-se 100% de positividade somente no LNM, enquanto que os órgãos sistêmicos apresentaram 67% de positividade, evoluindo para total negatividade no período de 7 dias. A negatividade no LNM começou a ser observada a partir de 72 horas (17%), sendo totalmente negativo também com 7 dias (figura 6).

Estes achados mostraram que existe uma diferença na capacidade de depuração bacteriana entre os compartimentos LNM e órgãos sistêmicos, denotando que o compartimento linfático intestinal apresenta características da resposta imune diferentes contra o antígeno invasor, quando comparado ao compartimento sistêmico.

Corroborando com estes achados, ao analisarmos, no grupo TB, a quantidade de bactérias translocadas/órgão, o crescimento bacteriano foi estatisticamente maior no LMN além de uma depuração mais lenta (figura 8). Tais achados sugerem a ação reconhecida da função “filtro” dos linfonodos de uma forma geral e, além disso, pode-se conjecturar uma ação “proposita” do GALT com o intuito de desencadear uma co-atividade na indução da resposta inflamatória sistêmica mediante desafio microbiano.

No processo inicial da TB, a bactéria da luz intestinal tem que vencer a primeira barreira composta pelas enzimas digestivas, pela espessa camada de muco rico em IgA, células epiteliais das vilosidades, macrófagos, linfócitos NK e linfócitos citotóxicos presentes no espaço intersticial e na lâmina própria para alcançar sítios extra-intestinais. Assim sendo, o LNM constituiria uma segunda linha de defesa imune local e sua ação poderia relacionar-se não só à eliminação do antígeno, como também ao desencadeamento da resposta adaptativa e conseqüente ativação das células de defesa posicionadas no LNM com subseqüente tráfego das células ativadas para a circulação sistêmica via linfa mesentérica eferente, processo este que possibilitaria não somente a ativação da defesa imune sistêmica como também a possibilidade do retorno destas células para sítios efetores da barreira intestinal ^{47, 48, 49, 50}.

No grupo Sham, a ausência da TB em todos os períodos da cinética de estudo, ressalta que o fator operatório somado a anestesia “per si” não foram estímulos capazes de induzir o fenômeno de TB, além de mostrar que um animal aparentemente sadio não apresenta condição de sobrecrecimento e ou alterações da barreira intestinal, capaz de desencadear o fenômeno da TB sob o estímulo cirúrgico somente.

Estes dados revelam que, após um processo agudo de indução de TB, por duas horas, sob a condição de sobrecrecimento microbiano intestinal, as bactérias translocadas podem permanecer por um período relativamente longo no hospedeiro, principalmente no compartimento do LNM. Estes achados enfatizam o papel da TB como um fenômeno relevante relacionado à possível ativação da resposta

inflamatória no hospedeiro mediante um desafio microbiano de origem intestinal especialmente numa condição clínica de doença grave concomitante.

Considerando que um único episódio curto de TB não provoca mortalidade apesar da permanência relativamente longa de bactérias em sítios extra-intestinais do hospedeiro ⁹⁷ avaliamos, sob microscopia intravital, se esta ocorrência poderia representar um estímulo suficiente para provocar danos na microcirculação mesenterial.

À microscopia intravital dos vasos linfáticos aferentes mesenteriais observou-se um aparente aumento da celularidade no grupo TB quando comparado ao grupo Sham, em todos os períodos estudados (figura 7). Tal observação nos sugeriu um processo de mobilização linfocitária a partir dos compartimentos imunes da parede intestinal em direção aos linfonodos do mesentério indicando o envolvimento da via linfática intestinal na ocorrência da TB. Além disso, vale ressaltar que apesar de não mais encontrarmos bactérias viáveis em nenhum compartimento a partir do 7º dia, o contínuo aumento do tráfego celular pela linfa aferente manteve-se presente, mostrando que a mobilização celular se inicia já nas primeiras 2 horas e prolonga-se até os 14 dias. Estes achados sugerem que a ativação do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) apresenta duração e efeito prolongada uma vez que o GALT é acionado. Apesar destas observações do tráfego celular pela linfa não terem sido quantitativas, o aumento da celularidade era facilmente observado, em maior proporção nos animais submetidos ao processo de TB quando comparado ao grupo Sham.

As lesões vasculares da microcirculação mesenterial foram expressivas a partir de duas horas, tornando-se a gravidade progressiva nas primeiras 24 horas (figura 8). A fase de resolução das lesões microcirculatórias iniciaram somente nos períodos de 7 e 14 dias apesar do estímulo ter sido por um único processo de TB.

Os achados do período de 72 horas foram compatíveis com o período de transição entre a fase máxima de inflamação e o início do processo de resolução inflamatória da microcirculação mesenterial. Estes dados sugerem que o processo de TB por duas horas provoca uma cadência inflamatória compatível com os períodos já estabelecidos pós uma lesão tecidual.

Dentre as alterações vasculares, (figura 10) a ocorrência de “rolamento” dos leucócitos e adesão leucocitária ao endotélio vascular das vênulas, associado principalmente ao processo de TB expressa o estado de ativação das células endoteliais e dos leucócitos circulantes pós TB.

O rolamento dos leucócitos esteve presente durante todos os períodos de estudo em ambos os grupos, sendo mais intenso nos períodos de 72 horas e 7 dias. A diferença quantitativa entre os grupos não pôde ser conferida por dificuldade de se realizar a contagem das aderências leucocitárias durante a microscopia intravital. No entanto, é um fato o trauma cirúrgico presente no grupo sham ser o fator indutor deste processo na ausência de TB. Além disso, nos animais do grupo TB as aderências leucocitárias também foram observadas nas arteríolas, fato este ausente no grupo Sham.

Ainda nos vasos sanguíneos, as vênulas e capilares apresentaram fluxo lentificado e ou parado, fato que igualmente ocorreu nos dois grupos e em todos os tempos. Porém, no grupo TB, esta alteração estava distribuída mais difusamente no período de 24 horas, com a lentificação inclusive de arteríolas e de vênulas de alto fluxo, mostrando ser a TB um fenômeno eminentemente pró-inflamatório de longa duração.

Estas alterações tornaram-se gradativamente menores ao decorrer do período evolutivo, assemelhando-se a uma microcirculação “normal” no período de 14 dias.

Outro achado associado ao processo de TB, foi a hemorragia perivascular com infiltrado celular observada somente na ocorrência de TB, sendo a sua expressão máxima com 24 horas, coincidindo com o período de pico da recuperação bacteriana extra-intestinal. O estudo evolutivo mostrou que estas lesões também foram melhorando com o tempo e no período de 14 dias as hemorragias estavam praticamente ausentes, denotando novamente ser esse o período necessário para a resolução da resposta inflamatória por um processo agudo de TB.

Do ponto de vista temporal, a máxima intensidade das hemorragias da microcirculação mesenterial coincidiram com os períodos de maior recuperação de bactérias nos compartimentos extra-intestinais (2, 6 e 24 horas), sugerindo que a presença da bactéria translocada tenha uma relação de proporcionalidade com estas lesões.

Assim, de forma geral, podemos inferir que neste modelo de estudo o fenômeno da TB ocasionou um aumento no tráfego celular dos ductos linfáticos aferentes além de lesões importantes tempo-dependentes e autolimitadas da microcirculação mesenterial.

Tendo em vista os achados de alteração da microcirculação mesenterial questionamos se estas lesões poderiam refletir em redução da perfusão tecidual local baseado na sua interdependência com o fluxo da microcirculação tecidual.

Além disso, seria de interesse científico a avaliação do papel da TB na gênese da hipoperfusão sistêmica, para melhor compreendermos a extensão do potencial deletério provocado por um processo de TB. Ellis CG ⁹⁸, 2005, citando Lehr HA, em artigo de revisão, relatou que os achados claramente indicavam que a patogênese da sepse tinha como base a disfunção da microcirculação.

A alteração da perfusão tecidual do grupo TB mostrou ser significativa tanto na parede intestinal como nos órgãos sistêmicos (figura 9). Novamente, o pico das alterações ocorreu no período de 24 horas, com significativa diminuição generalizada da perfusão tecidual (fígado, rins, intestino), achado este que pode ser correlacionado às lesões observadas na microscopia intravital e índice de recuperação bacteriana decorrente da TB (figura 8). Estes resultados nos permitem auferir que o efeito de um processo de TB apresenta repercussões sistêmicas da microcirculação tecidual, com conseqüente hipoperfusão intestinal.

Como era de se esperar, a perfusão tecidual no grupo Sham mostrou discreta elevação, a qual poderia ser decorrente do uso da solução fisiológica neste grupo. Evidenciando que o processo operatório associado à anestesia “per si”, apesar das alterações focais do fluxo de vênulas de baixo fluxo observado em todos os períodos de estudo pela intravital, não foram suficientes para provocar danos à perfusão tecidual local e sistêmica.

Ao analisarmos os dados de índice e percentual de TB associado às alterações da microcirculação mesenterial e perfusão local e sistêmica, pudemos observar que um processo agudo de TB provocou alterações importantes de forma tempo-dependentes, porém autolimitadas. Ince C. 2005 ⁹⁹ referiu que o funcionamento normal da microcirculação é o principal pré-requisito para uma adequada oxigenação tissular e função fisiológica do órgão e que alterações regionais causadas por disfunção microcirculatória e mitocondrial constituem a base para o desenvolvimento ou agravamento de um estado de sepse e choque.

Considerando que a rota de tráfego das bactérias translocadas pode ocorrer por via linfática e hematogênica, em observações anteriores verificamos que somente a via linfática de translocação estava relacionada à provocação da lesão da microcirculação mesenterial, as quais puderam ser evitadas por meio da exclusão da linfa eferente mesenterial durante o processo de TB ¹⁰⁰.

Por outro lado, os resultados do leucograma sanguíneo com ausência de mudanças significantes no número de leucócitos do sangue nos períodos estudados pós-TB, mostrou que as possíveis alterações geradas por um episódio agudo de TB

não foram estímulos suficientes para refletir de forma sistêmica. Além disso, Koo DJ e col¹⁰¹. 1999 mostraram que após um episódio de sepse pelo método de CLP não foram observadas diferenças detectáveis nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue sistêmico ou da veia porta. Estes autores corroboram com a nossa hipótese de que após um episódio agudo de TB as alterações imunológicas iniciais ocorrem principalmente no ambiente intestinal, denotando que os monitoramentos sistêmicos não são tão eficazes para avaliar as alterações conseqüentes de um processo de TB. (figura10)

A avaliação dos componentes celulares e humorais que trafegam pela linfa eferente na vigência de um processo de TB por meio de linfograma, citometria de fluxo e ensaio utilizando o CBA-Flex para mediadores pró e antiinflamatórios, foi realizado com o intuito de avaliar o reflexo da ativação do GALT por um processo de TB.

A análise da quantificação das células da linfa através do linfograma mostrou que, no grupo TB, um número significativo de células trafega do intestino para a circulação sistêmica pós um episódio de TB, constituindo-se em um efeito prolongado. Este fato induz a pensar que a linfocitose do ducto mesenterial parece ter origem no compartimento de defesa imunológica do intestino como um todo, ou seja, no GALT ⁶¹, sugerindo que os linfócitos devam ser parte importante da resposta do organismo a um processo agudo de TB, reiterando alguns autores ^{25, 27} e contrapondo outros ²⁶ que questionam a participação de linfócitos na defesa contra a TB. (figura 11)

Para melhor compreender o fenômeno de mobilização linfocitária e sua relação na defesa do organismo durante e após um desafio bacteriano de origem intestinal, avaliamos as células da linfa, através da citometria de fluxo, empregando anticorpos específicos para a determinação das subpopulações linfocitárias. Em estudo anterior ⁴⁶ de nosso laboratório foram observados os leucócitos da linfa eferente com 2 horas pós-TB, a qual mostrou ser composta em 97% por linfócitos.

Os achados da citometria mostraram que os linfócitos presentes na linfa eferente de ambos os grupos eram do tipo linfócitos T (83%), sendo 75% linfócito Tauxiliar, 15% linfócitos Tcitotóxico e cerca de 12% de linfócitos B nos períodos estudados. (figuras 12 a 21)

A avaliação da subpopulação destas células revelou que o linfócito Tauxiliar foi composto de 55% *naive* (virgem), 15% ativados e 45% de memória (figuras 18 a 20). Nos linfócitos Tcitotóxico 75% foram Tcitotóxico *naive* (virgem), 5% ativados e 25% de

memória (figuras 21 a 23). Esta análise da porcentagem das subpopulações linfocitárias não evidenciou diferenças entre os grupos Sham e TB em todos os períodos estudados. Esses achados nos mostram que na ausência e/ou presença de bactéria, a porcentagem de subpopulações linfocitárias da resposta imunológica do GALT não se modifica quanto a sua proporção celular. No entanto, ao relacionarmos esses achados ao número absoluto de células da linfa, podemos observar que apesar de não ocorrer mudança na porcentagem dos subtipos linfocitários, há uma maior e significativa mobilização celular em direção ao compartimento sistêmico pós um desafio antigênico intestinal. Tal fato poderia ser devido à expansão clonal dos linfócitos na presença de antígenos no GALT na vigência da TB e ou pela necessidade do tráfego das células imunes da barreira intestinal, ativadas pela passagem das bactérias, concluindo a imunidade adaptativa e retornando ao território intestinal reforçando a imunidade local.

Baseado na transformação da porcentagem de cada subpopulação linfocitária encontrada na citometria de fluxo em número absoluto, proporcional ao achado do linfograma (figuras 22 a 45), observou-se diferença expressiva desde os períodos iniciais até o último período de 14 dias entre os grupos Sham e TB, sendo que as subpopulações analisadas apresentaram diferença estatisticamente significativa nos diferentes tempos de estudo para todos os subtipos celulares. Fato este que evidencia com clareza que um processo agudo de TB é capaz de induzir a ativação da resposta imune do hospedeiro pela ativação do GALT alcançando a circulação sistêmica pelo ducto torácico, com predominância dos linfócitos T, que corresponderam a cerca de 83% da população de linfócitos da linfa. Quando analisamos as subpopulações dos linfócitos T, ocorreu predomínio dos linfócitos T auxiliares e nestes a forma *naïve* foi a mais observada, denotando o papel da linfa mesentérica eferente na amplificação da resposta inflamatória sistêmica e também da resposta imune intestinal através do processo de *homing*. Este fenômeno ocorreu predominantemente nas primeiras 24 horas, coincidente com a maior presença de bactérias translocadas para os sítios extra-intestinais. Estes achados nos revelam a relação intrínseca entre o ambiente intestinal e sistêmico pela via linfática, denotando a relevância de estímulos patológicos intestinais em relação à resposta imune sistêmica, como observado neste processo de TB.

Uma vez observado que o fenômeno de TB desencadeava mudança na migração linfocitária do território do GALT, a qual estabelece a comunicação entre os compartimentos intestinal e sistêmico pela via linfática, aventamos a hipótese desta

linfa não estar carreando somente células, mas também citocinas. Corroborando com esta hipótese, os relatos da literatura referem que o intestino pode ser um importante sítio produtor de citocinas devido à ativação do GALT. Mainous ⁴⁵ e col. (1995) estudaram a produção de citocinas (TNF- α e IL-6) em modelo animal de TB com Zimosan, relatando a presença elevada destas citocinas na linfa mesentérica e no sangue portal em relação ao grupo controle. Em 1998, Magnotti ⁵² mostrou, em estudo experimental, que a linfa mesentérica pós-TB provocava lesões no pulmão. Em nosso laboratório, estudos preliminares, mostraram que o bloqueio da linfa mesentérica para a circulação sistêmica impediu os danos à microcirculação mesentérica associado à TB, sugerindo assim, a importância da via linfática na gênese da resposta inflamatória. Já, Ruiz-Silva e col ⁴⁶. (2002) mostraram aumento de TNF- α na linfa mesentérica eferente e ausência de detecção do mesmo na circulação sistêmica, após 2 horas de indução de TB.

Assim, avaliamos os componentes do sobrenadante da linfa mesentérica eferente associado ao processo de TB a fim de mensurar as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, INF- γ e TNF- α) e antiinflamatórias (IL-10) (tabela 3; figura 46). Esta avaliação foi restrita ao período de 72 horas baseado nos achados do grupo piloto, onde foi observado ausência da expressão de todas as citocinas nos períodos subsequentes ao de 72 horas (7 e 14 dias).

Dentre as citocinas classificadas como pró-inflamatórias, analisamos o interferon-gama (INF- γ), por ser secretado principalmente por linfócitos T citotóxicos e linfócitos Tauxiliares ativados além de ser um potente ativador de macrófagos, portanto relacionados à indução e ativação da resposta imunológica adquirida e da resposta inflamatória aguda. Neste experimento, o INF- γ não mostrou ser uma citocina relevante na linfa eferente associada ao procedimento cirúrgico e da TB.

A IL-6 é uma citocina sintetizada pelos fagócitos, células endoteliais, fibroblastos, células T ativadas e outras células em resposta a IL-1 e TNF- α . Nos hepatócitos estimula a produção de proteínas de fase aguda e nos linfócitos B a produção de anticorpos e também se encontra em níveis elevados pós-infecção bacteriana por Gram-negativos, atuando como uma citocina pró-inflamatória.

A mensuração da interleucina-6 mostrou a influência do processo de TB na sua ativação pelo sistema imune intestinal. As elevações nos níveis desta citocina na linfa mesentérica mostraram-se maiores no grupo TB em todos os períodos do estudo, sendo estatisticamente significativa nos períodos de 2 horas e 24 horas.

Além disso, após o período agudo de 2 horas de TB observamos crescente concentração ao longo do tempo de estudo sendo a sua concentração máxima na linfa mesentérica com 24 horas, permanecendo elevada até 72 horas quando comparada ao grupo Sham. Denotando que o processo de TB constitui um evento pró-inflamatório importante e de duração prolongada. Estes achados permitem especular que o aumento de IL-6 na linfa eferente deva ser decorrente da ativação das células envolvidas no GALT, reiterando o importante papel do GALT na TB como um tecido capaz de induzir uma resposta inflamatória e transportar os seus produtos pela linfa até a circulação sistêmica, podendo provocar a magnificação da resposta inflamatória sistêmica. A mensuração de outros mediadores pró-inflamatórios possa enfatizar ainda mais esta hipótese que parece ser extremamente relevante na hipótese intestinal da SIRS e da sepse.

Dentre os mediadores pró-inflamatórios o TNF- α é considerado o mediador mais importante na geração da resposta inflamatória, assim incluímos a mensuração do TNF- α neste experimento conforme descrito no método. No entanto a baixa sensibilidade do CBA-Flex em relação a este mediador não permitiu distinguir as diferenças entre os grupos, inviabilizando a inclusão desta citocina em nossos resultados.

Quando analisamos o mediador antiinflamatório IL-10, o qual é produzido pelos monócitos, linfócitos B ativados e linfócitos Tauxiliar e citotóxico^{61,73,101}, observou-se um perfil semelhante ao da IL-6, sendo maior no grupo TB nos períodos de 2, 6 e 72 horas em relação ao grupo Sham, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 71). Este comportamento denota que na vigência de resposta inflamatória, as citocinas de ação oposta estão sempre presentes, desencadeando a resposta final decorrente da dominância de uma sobre a outra.

Considerando que, os monitoramentos realizados como a presença de lesão da microcirculação, redução da perfusão e recuperação de bactérias no hospedeiro revelaram que a ação inflamatória máxima de um evento de TB ocorre nas primeiras 24 horas, persistindo elevada até 72 horas, pode-se correlacionar com a atividade crescente do antiinflamatório (IL-10) nas primeiras horas (6 horas) e decréscimo do mesmo nos períodos posteriores, denotando a prevalência da ação pró-inflamatória sobre a antiinflamatória.

A análise geral das citocinas do sobrenadante da linfa nos permite sugerir que a balança que rege a resposta inflamatória entre as citocinas pró e antiinflamatória foi

vencida pelo lado pró-inflamatório de forma tempo-dependente a partir de um estímulo bacteriano intestinal. Estes dados nos permitem especular que possa haver uma correlação entre a concentração de IL-6 e a piora nas alterações da microcirculação do mesentério e da perfusão tecidual, ambas com picos observados no período de 24 horas, denotando assim, um aumento da intensidade da resposta pró-inflamatória, tempo-dependente, decorrente do desafio bacteriano determinado pelo processo de TB.

As citocinas, tanto pró-inflamatórias como antiinflamatórias sempre estiveram em maiores concentrações no grupo TB nos períodos estudados quando comparado ao grupo Sham, mostrando que o estímulo da TB potencializou a resposta imune do hospedeiro comparado à situação de ausência de antígeno bacteriano (grupo Sham), reiterando a importância da via linfática da TB no transporte de mediadores e na influência da resposta inflamatória no ambiente sistêmico.

A análise global dos resultados nos permite auferir que um processo agudo de TB resulta em múltiplas alterações no hospedeiro compatíveis com um estado de inflamação sistêmica relativamente longo e com potencial para desencadear o agravamento da resposta inflamatória do hospedeiro^{102,103}. Neste contexto, o papel da ativação do GALT parece ter uma importante influência no desencadeamento da SIRS.

Considerando que o processo de TB nos pacientes pode não estar limitado a um único episódio, a somatória de alterações decorrentes de repetidos ou prolongados episódios de TB apresenta um potencial relevante na gênese ou agravamento da sepse. No entanto estudos clínicos que mimetizem semelhantes situações experimentais precisam ser realizados para subsidiar a hipótese intestinal da sepse.

5 Conclusão

1. Um episódio agudo de TB determinou uma recuperação máxima bacteriana com 6 horas e sua completa depuração entre 3 e 7 dias.
2. Um único episódio de TB provocou alterações da microcirculação local e sistêmica associadas à ativação do GALT, principalmente no período de permanência das bactérias translocadas no hospedeiro, sendo significantes principalmente nas primeiras 24 horas.
3. A via linfática mesenterial mostrou ser uma rota importante na intercomunicação imunológica entre o ambiente intestinal e sistêmico no processo de translocação bacteriana.

6 Referências

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310.
2. Murphy SL. Deaths final data for 1998. National vital statistics report. Vol. 48. No. 11. Hyattsville, Md.: National Center for Health Statistics, 2000- 1120 0-0487.
3. Salomão R, Wey SB, Pignatari AC, Castelo Filho AC. Epidemiology of bacteremias at a university hospital. *Rev Assoc Med Bras*. 1992; 38(2):62-6.
4. Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Crit Care* 2004;8(4):R251-60.
5. Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, weisbrodt NW, Moore FA: Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001;15:1-10.
6. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:143-151.
7. Fink MP, Delude RL: Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the patogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005;21:177-196.
8. MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ. Gut origem of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223-228.
9. Berg RD, Garlignton AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-411.
10. Koh IHJ, Silva R. Novel In Vitro Small Intestinal Graft Model for Study of Bacterial Translocation in the Rat. *Transplantation Proceedings* 1996;28:2667-2668.
11. Berg RD. Promotion of the translocation of enteric bactéria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicilin, clidamycin or metronidazole. *Infect immune* 1981;33:854-861.
12. Deitch E.A. Bacterial translocation of the gut flora. *J. Trauma* 1990;30:184-189.

13. Berg R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J. Med* 1992;23:217-244.
14. Morehouse JL, Specio RD, Stewart JJ, Berg RD. Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. *Gastroenterology* 1986;91:673-682.
15. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Curr Microbiol* 1983;8:285-292.
16. Mainous M, Tso P, Berg RD, et al. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991;126:33-37.
17. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, et al. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J. Trauma* 1991;31:629-638.
18. Koh IHJ, Montero EFS, Keller R, Abreu MCG, Goldemberg S, Silva RM. Can the portal vein be a conduit for bacterial translocation? *Transplant Proc* 1996;28:2671.
19. Lemaire LCJM, Van Lanschot JB, Stoutenbeek CP, et al. Thoracic duct in patients with multiple organ failure: no major route of bacterial translocation. *Ann Surg* 1999;229:128-135.
20. Wolochow H, Hildebrand GJ, Lamanna C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J Infect Dis.* 1966;116:523-8.
21. Van Leeuwen Pam, Boermeester Ma, Houdijk Apg, Ferwerda C, Cuesta Ma, Meyer S And Wesdorp Ric. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994;(suppl. 1):S28-S234,.
22. Meakins JL, Marshall JC. In Marston A, Bulkley GB, Fiddian-Green RG, Haglund UF. The gut as the motor of multiple system organ failure. *Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure.* LONDON: EDWARD ARNOLD, 1989, pp 339-348.
23. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, et al. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998; 42; 29-35.
24. Silva R, Keller R, Montero E, Silva M, Goldenberg S, Koh IHJ. Role of Peyer's Patch in Bacterial Translocation. *Transplantation Proceedings* 1996;28:2672.

25. Owens WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of thymectomized mice. *Curr. Microbiol.* 1982;7:169-174.
26. Maddaus MA, Wells CL, Platt JL, Condie RM, Simmons RL. Effects of T-cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph nodes. *Arch. Surg* 1988;207:387-398.
27. Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1994;62(7):2874-84.
28. Reynolds JV, Murchan P, Leonard N, et al. High-dose interleukin 2 promotes bacterial translocation from gut. *British Journal of Cancer*, 1995;72:634-636.
29. Schirmer WJ, Shirmer JM, Naff GG, Fry DE. Systemic complement activation produces hemodynamic changes characteristic of sepsis. *Arch. Surg* 1988;123:316-321,
30. Ming Yao, Soheyl Bahrami, et al. Pathogenesis of hemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats. *Yong- Annals of Surgery* 1995;221:398-405,.
31. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348: 138- 150.
32. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420. 2002;885-891, 19/26 December.
33. Goris RJA, Beekhorst TPA, Nuytinck JKS, Gibrere JSF. Multiple organ failure: generalized autodestructive inflammation? *Arch. Surg* 1985;120:1109-1115.
34. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
35. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies en sepsis. *Chest* 1992;101 1644-1655.
36. Stone R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 1994;264:365-367.
37. Hinshaw L.B. Sepsis/Septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996;24:1072-1078.
38. Rotstein OD. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination. *Surg Infect (larchmt)* 2000;1:217-225.

39. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J. Trauma* 1988;28:896-906.
40. Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock and gut translocation. *New Horiz* 1996;4:289-299 ().
41. Johnston JD, Harvey CJ, Menzies IS, Treacher DF. Gastrointestinal permeability and absorptive capacity in sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:1144-1149.
42. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417 ().
43. Souba WW, Smith RJ. & Wilmore DW. Glutamine metabolism by the intestinal tract. 1985;FPEN 9:608-616.
44. Bradtzaeg P, Valnes K, Scott H, Rognum TO, Bjerke K, Baklein K. The human gastrointestinal secretory immune system in health and disease. *Scand J Gastroent* 1985;20:17-38.
45. Mainous MR, Ertel W, Chaudry JH, et al. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 1995;4:193-199.
46. Ruiz-Silva M, Silva RM, Menchaca-Diaz JL, Siqueira AFRS, Buzzutti FI, Siliano PR, Tajiki MH, Salomão R, Fagundes-Neto U, Morais M, Koh IHJ. Substantial changes in the intestine-derived lymph during bacterial translocation. *Transplant Proc* 2002;34(3):1001-2.
47. Fasano A. Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *Am J Physiol.* 1999;276:C765-C776.
48. Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambraud L & Maroux S. The filamentous brush border glycolcalyx a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur J Biochem* 1995;228:323-331.
49. Husband AJ & Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of Ig-A-containing cells in the intestine. *J Exp. Med* 1978;148:1146-1160.
50. Sansonetti P. Host-patogen interactions the seduction of molecular cross talk. *Gut* 2002;50(Suppl 3)S2- S8.
51. Matsunaga T. Did the first adaptative immunity evolve in the gut of ancient jawed fish? *Cytogenet Cell Genet* 1998;80:138-141.
52. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J. Burn Care Rehab* 2005; 26: 383-91.
53. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 290-300.

54. Sprent J. & Tough D. F. T cell death and memory. *SCIENCE* 2001;293:245-248.
55. Nicoletti C. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 2000;47:735-739
56. Kelsall B L. & Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996;183:237-247.
57. Johanson-Lindbom B, et al. Selective generation of gut tropic T cell in gut-associated lymphoid tissue (GALT) requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med*. 2003;198:963-969.
58. Rescigno M, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2001;2:361-367.
59. Newberry RD, Lorenz RG. Organizing a mucosal defense. *Immunol reviews* 2005; 206: 6-21.
60. Arstila T et al. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med* 2000;191:823-834.
61. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução da 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
62. Schlans KS & Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Rev Immunol* 2003;3:269-279.
63. Cebra JJ; Komisar JL, Schweitzer PA. CH isotype switching during normal B-lymphocyte development. *Ann Rev Immunol* 1984;2:493-548.
64. Pabst O, et al. Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med* 2004; 199: 411-416.
65. Berlin C, et al. Alpha 4 Beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74:185-195.
66. Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit. Care* 2003; 7: 291-307.
67. Pinsky MR. Sepsis: a proinflammatory and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. *Contrib Nephrol* 2001; 132: 354-366.
68. Al Dawoud A., Nakshabendi I., Foulis A. et al. Immunohistochemical analysis of mucosal gamma-interferon production in coeliac disease. *Gut* 1992;33:1482-1486.

69. Holmgren J, Fryklund J, Larsson H. Gamma-interferon-mediated down-regulation of electrolyte secretion by intestinal epithelial cells: a local immune mechanism. *Scand Immunol* 1989;30:499-503.
70. Sollid L.M., Kvalve D., Brandtzaeg P., et al. Interferon-Gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulin. *Immunol* 1987;138:4303-4306.
71. Patrick DA, Moore FA, Moore EE, Biffi WL, Sauaia A, Barnett CC. The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1996; 172: 425-431.
72. Roumen RMH, Hendriks T, van der Ven-jongekrijg, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma: relation with subsequent ARDS and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993;6:769-776.
73. Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, and Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevent lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 1993;177:547-550.
74. Koh IHJ, Montero EFS, Keller R et al. Can bacterial translocation to the mesenteric lymph node be correlated with systemic infection? *Transplant Proc* 1996;28:2663.
75. Menchaca-Diaz JL. Translocação bacteriana na vigência da sepse e sua influência na evolução clínica da sepse. Estudo experimental [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003.
76. Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528.
77. Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1985;15:168-173.
78. Johnson P, Malt A. CD45: A family of leukocyte-specific cell surface glycoproteins. In Weir's handbook of experimental immunology, vol.2 Blackwell Science, Cambridge, MA, pp 62.1-62.16.

79. Wagner SD, Montalvo HJr, Hauschild CL, Vanhooose AM, Wang CH. Rapidity and multiplicity of synthesis and expression of immunoglobulin isotypes by B lymphocytes in the small intestine. 2004;9:1642-53.
80. Nicolls MR, Aversa GG, Pearce NW, Spinelli A, Berger MF, Gurley KE, Hall BM. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. Transplantation. 1993;55:459-468.
81. Morris DL, Komocsar WJ. Immunophenotyping analysis of peripheral blood, splenic, and thymic lymphocytes in male and female rats. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 1997;37:37-46.
82. Jefferies WA, Green JR, Williams AF. Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 1985; 162:117-127.
83. Liu L, Zhang M, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. J. Immunol. 1998;161:1146-1155.
84. Bañuls MP, Alvarez A, Ferrero I, Zapata A, Ardavin C. Cell-surface marker analysis of rat thymic dendritic cells. Immunology. 1993;79:298-304.
85. Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW, Williams AF. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. 1980;10:609-615.
86. Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Huni T. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. Eur. J. Immunol. 1992;22:2841-2848.
87. Mason DW, Arthur RP, Dallman MJ, Green JR, Spickett GP, Thomas ML. Functions of rat T-lymphocyte subsets isolated by means of monoclonal antibodies. Immunol. Rev. 1983;74:57-82.
88. Bunce C, Bell EB. CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. J. Exp. Med. 1997;185 (4):767-776.
89. Hargreaves M, Bell EB. Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC⁺ 'revertant' memory and CD45RC⁺ naive CD4 T cells. Immunology. 1997;91:323-330
90. Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, Williams AF. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 M detected only on CD4 positive T blasts. Mol. Immunol. 1987;24:1281-1290.

91. Dignass AU, Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 1996;225:422-429.
92. Dignass AU, Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 2002
93. Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, McClintock P, Reid Y. ATCC. Cell Lines and Hybridomas 1994; 75.
94. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 3rd Ed. Wiley-liss, Inc., New York, NY, 1995;280-281
95. Holmes CL, Russel JA, Willey KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115.
96. Sánchez-García M., Prieto A., Tejedor A., Martín-Duce A., Fernández-Sánchez F.J., Granell J., Characteristics of thoracic duct lymph in multiple organ dysfunction syndrome. *Arch Surg* 1997;132:13-18.
97. Koh IHJ, Liberatore AMA, Menchaca-Díaz, Ruiz-Silva M, Vilela-Oliveira L e col. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets.* 2006;6:7-16.
98. Ellis CG, Jagger J, Sharpe M. The microcirculation as a functional system. *Crit Care.* 2005;9(4):S3-S8.
99. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care.* 2005;9(4):S13-S19.
100. Koo DJ, Zhou M, Jackman D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P. Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis? *Biochim Biophys Acta.* 1999;1454:289-295.
101. Murray P.J., Wang L., Onufryk C., Tepper R.I., and Young R.A. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J. immunol* 1997;158:315-321.
102. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, Unsinger J, Dunne WM, Hotchkiss RS. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant “two-hit” model of sepsis. *Shock* 2006; 26: 565-570.
103. Leaphart CL, Tepas JJ. The gut is a motor of organ system dysfunction. *Surgery* 2007;141:563-9.

7 Normas adotadas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Apresentação de originais: NB-1139, Rio de Janeiro, 2000.

DeCS – Descritores em Ciências de Saúde - nº. 01/88: Normas de pesquisas em saúde. Bioética 1995, 3:137-54.

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE RELATÓRIO DE PESQUISA (edição eletrônica-disquete). São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE; Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/tpce/pg>

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA CITAÇÕES E REFERÊNCIAS (edição eletrônica-disquete) São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE, 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>

Conflito de interesses: nenhum.

Anexo 1

Protocolo de Preparo e Armazenamento da Linfa

A coleta da linfa ocorreu acompanhando a cinética de estudo. Foi realizada por 2 horas, iniciando sempre 2 horas antes do término do tempo da cinética.

Com seringa de 1 mL estéril, previamente aspirou-se 0,1 mL de EDTA.

Após a cateterização do ducto e fixação do cateter iniciou-se a coleta. A seringa foi posicionada sobre uma superfície com gelo a fim de se manter uma baixa temperatura, para a conservação principalmente das citocinas.

Ao término da coleta retirou-se 20 µl para a determinação do número de células em Câmara de Neubauer, associando o corante azul de Tripam para a contagem somente de células viáveis. Após determinação da concentração desejada (1×10^6) determinaram-se as alíquotas para o conteúdo celular.

A amostra foi então retirada da superfície resfriada, colocada em um microtubo para centrifugação à 4°C, na velocidade de 2000 rpm, por um tempo de 10 minutos. Com este procedimento separou-se o sobrenadante das células, que ficaram no fundo do microtubo. Em ambiente estéril (fluxo laminar) o sobrenadante foi pipetado em volume de 200µl, previamente determinado, de acordo com o teste que seria realizado para a pesquisa de citocinas, teste CBA-Flex. As alíquotas foram identificadas e armazenadas em freezer a -70°C. As células foram re-suspendidas, em solução de congelamento (soro fetal bovino 0,9 mL: 0,1 mL DMSO (soro fetal bovino com 10% de dimetilsulfóxido) e alíquotas de 1mL foram identificadas e encaminhadas para freezer a -70°C.

Anexo 2

Soluções e Meio de Cultura utilizados nos experimentos.

1- Meio de cultura RPMI 1640 pH=7,0

Meio RPMI 1640 autoclavável (Sigma)

10 IU/mL penicilina G (Gibco, Gaithersburg, MD, EUA)

10 µg/mL estreptomicina sulfatada (Gibco)

200 mM L-glutamina (Sigma)

10% de soro fetal bovino (Gibco)

2- PBS 0,15 M pH=7,2

NaCl 8,0g (LabSynth, Diadema, SP, BR)

KH₂PO₄ 0,2g (LabSynth)

Na₂HPO₄ 1,15g (LabSynth)

KCl 0,2g (LabSynth)

Água destilada q.s.q. 1000mL

3- PBS 1% azida de sódio

PBS 100 mL

NaN₃ (Sigma) 1g

4- Tampão de marcação

PBS

1% soro fetal bovino

0,1% de azida de sódio

pH desta solução deve estar entre 7,4 – 7,6

Anexo 3

Cytometric Bead Array

Rat Soluble Protein Master Buffer Kit

A citometria de fluxo é uma ferramenta de análise que permite a descrição de diferentes partículas baseada no tamanho e fluorescência. O CBA emprega partículas com diferentes intensidades de fluorescência para detectar substâncias solúveis e é combinado com a citometria de fluxo para criar um imunoenensaio baseado em partículas.

O sistema CBA usa a sensibilidade de amplificar a detecção de fluorescência por citometria de fluxo para mensurar partículas solúveis. Cada partícula do CBA proporciona uma superfície de captura para proteína específica, como na placa de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), permitindo analisar as citocinas com um pequeno volume de amostra.

O sistema usa uma única população de partícula de mesmo tamanho e complexidade, mas com intensidade de fluorescência distinta, revestidas com anticorpos de captura específicos para proteínas solúveis, obtendo valores de substâncias em um tempo substancialmente menor (comparado com o ELISA convencional), obtendo valores de substâncias desconhecidas em um tempo substancialmente menor (comparado com o ELISA convencional).

A cada partícula é dada uma designada posição alfa-numérica, utilizando os canais APC e APC-Cy7 no citômetro BD FACSCanto, identificando a posição de cada partícula. Partículas com diferentes posições podem ser combinadas em um ensaio, a fim de criar um ensaio multiplex.

A detecção foi feita com anticorpos específicos conjugados com PE.

Preparação das Amostras

As amostras foram diluídas pelo fator de diluição previamente estabelecido, usando volume apropriado de diluente do ensaio. As amostras de soro foram diluídas pelo menos 1:4 antes de serem transferidas aos tubos de ensaio. Nos tubos de ensaio foram misturadas vigorosamente antes de serem transferidas aos tubos de aquisição contendo as beads de captura. Para facilitar a análise pelo software, foi carregado a série de diluições do mais concentrado para o menos concentrado.

Preparação dos Padrões

Foi retirado um padrão liofilizado de cada citocina testada. Os padrões foram reconstituídos com 2,0 mL de diluente de ensaio e deixados por pelo menos 15 minutos para o equilíbrio, evitando agitar. Em seguida, os padrões foram colocados dentro de um tubo cônico de 15 mL e etiquetado como Top Standard (20000 pg/mL).. Foram então, etiquetados e arrumados em ordem de diluição 1:2 (10000; 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156 e 80 pg/mL). Em seguida pipetou-se 500 µL de diluente de ensaio em cada tubo, efetuando-se uma diluição seriada, transferindo 500 µL do tubo *Top Standard* para o tubo de diluição 10000 pg/mL e agitando. Continuou-se fazendo as diluições até o valor de 80 pg/mL. Misturou-se com a pipeta. Por fim preparou-se um tubo contendo diluente de ensaio para servir como controle negativo (0 pg/mL).

Preparação do Reagente de Detecção PE

Os reagentes de detecção estão 50x concentrado e devem ser protegidos da luz.

A preparação do reagente de detecção começou com a determinação do número de citocinas do ensaio, do número de testes a serem corridos (amostras e padrões) e do volume total de reagente de detecção necessário para cada experimento. Cada tubo necessitou 50 µL de reagente de detecção diluído (p.e. 35 testes x 50 = 1750 µL). Seguiu-se então com a determinação do volume necessário de cada reagente de detecção 1,0 µL = 1 teste. Por fim, determinou-se o volume de diluente de reagente de detecção, que foi calculado subtraindo-se o volume de cada reagente de detecção testado do valor obtido no item 3 (p.e. usando 4 citocinas: 1750 µL – (35 µL x 4) = 1610 µL). Com estes passos realizados foram pipetados os reagentes de detecção e seu diluente em um tubo etiquetado como Reagente de Detecção, guardado a 4°C protegido da luz até o uso.

Procedimento do Ensaio

O procedimento de ensaio iniciou-se com a preparação das amostras, reagentes e padrões. Os tubos de citometria foram etiquetados para a curva padrão e para as amostras a serem testadas. As partículas de captura foram misturadas no vórtex por pelo menos 5 segundos, adicionando-se 50 µL delas a cada tubo. Outros 50µL de cada padrão ou amostra foram adicionados aos seus respectivos tubos. O conteúdo dos tubos foi delicadamente misturado e a seguir incubado por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir 50µL do reagente de detecção foi adicionado, e novamente se procedeu à mistura do conteúdo dos tubos de forma delicada e incubação por 2

horas à temperatura ambiente. Foi então adicionado 1 mL de tampão de lavagem a cada tubo e centrifugado à 200 x g por 5 minutos, aspirou-se cuidadosamente e descartou-se o sobrenadante de cada tubo. Foi adicionado 300 µL de tampão de lavagem a cada tubo, misturado no vórtex brevemente, iniciando a corrida no citômetro.

Anexo 4

Índice de translocação bacteriana

Tabela 1

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo Sham-2H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 2

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-2H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	2,81	1,49
2	3,52	1,47
3	2,83	1,46
4	2,13	1,3
5	4,46	2,48
6	4	2,34
Média	2.83	1.33
DP	0.9832	0.51

2h (LMN vs B+F) $p=0.0143^*$

Tabela 3

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo sham-6H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 4

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-6H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	2,49	2,40
2	4,38	1,49
3	3,85	1,30
4	3,52	1,93
5	3,85	2,47
6	3,56	2,34
Média	3,00	1,50
DP	0.6325	0.5477

6h (LNM vs B+F) $p = 0.0412^*$

Tabela 5

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo sham-24H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 6

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-24H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	4,18	2,48
2	3,33	0
3	2,83	1,47
4	2,13	1,93
5	3,30	0
6	2,97	2,31
Média	2.66	1
DP	0.8165	0.8944

24h (LNM vs B+F) $p=0.0412^*$

Tabela 7

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo Sham-72H.
Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 8

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-72H. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	3,59	1,93
2	2,97	1,30
3	0	0
4	3,20	2,34
5	2,34	0
6	2,75	0
Média	2	0.6667
DP	1.0954	0.8165

72h (LNM vs B+F) $p = 0.0412^*$

Tabela 9

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo sham-7dias.
 Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 10

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-7dias. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 11

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo Sham-14 dias.
Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Tabela 12

Recuperação de bactérias (ufc/ml) por compartimento do grupo TB-14 dias. Valor expresso em \log_{10}

Animal / Órgãos	Linfonodo Mesenterial	Baço e Fígado
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
Média	0	0
DP	0	0

Anexo 5

Perfusão tecidual

Tabela 13.

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo Sham no período 2 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
1	15.2	26.5	15.1	24.3	26.5	35.3	50.3	51.5	49	49.1
2	18	32.1	14.2	22.5	25.2	31.7	42.9	55.2	46.8	56.1
3	18.5	30.7	12.2	17.8	26.7	29.8	42.3	46.4	45.1	51.4
4	13.7	19.8	13.4	19.6	29.2	37.7	39	41.3	34.9	44.1
5	14.2	20.4	12.1	20	22.2	28.2	48.3	48.4	48.1	49.3
6	11.3	17.5	10.3	15.8	25.3	28.8	48.7	49.9	50.1	48.9
Média	15.15	24.5	12.88	20	25.85	31.91	45.25	48.78	45.66	49.81
DP	2.726	6.133	1.712	3.078	2.298	3.819	4.472	4.725	5.553	3.906

Tabela 14

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo sham no período 6 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas
1	4.9	4.1	2.8	3.3	30.6	24.6	38.8	36.3	40	36.6
2	4.9	5.7	2.4	3.7	30.6	24.7	39.1	37.4	40.8	37.1
3	5	5.8	2.2	3.8	30.6	24.9	40.6	37.3	40.4	38.7
4	4.5	4.9	1.7	3.4	31	25.7	38.2	36.4	39.1	37.6
5	4.1	4.9	2.5	3.5	29	24	38.7	36.6	39	37.7
6	4.66	5.13	2.5	4.43	29.1	23.96	38.63	33.86	39.26	36.4
Média	4.67	5.08	3.88	3.68	30.15	24.6	39	36.31	39.76	37.35
DP	0.3768	0.6943	0.4087	0.2074	0.7797	0.614	0.9094	0.5148	0.7925	0.7829

Tabela 15

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo sham no período 24 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas
1	5.3	5.2	2.5	2.2	24.6	22.4	42.2	38.5	45.2	38.9
2	5.1	5.2	1.9	2.9	22.5	20.6	41.5	38.6	44.1	38.3
3	5	5.2	2.7	2.2	27.4	24.2	42.5	39	43.4	38.5
4	5.4	5.16	2.4	2.3	25.83	22.76	41.33	40.3	40.4	37.9
5	5.33	5.63	2.43	2.9	28.33	25.66	41	41	40.66	37.66
6	5.5	5.46	2.33	3.3	26.33	26.66	41.33	39.66	42	39.66
Média	5.2717	5.3083	2.3767	2.6333	25.8317	23.7133	41.6433	39.51	42.6267	38.4867
DP	0.1877	0.1917	0.2655	0.4633	2.0769	2.2377	0.5787	0.9975	1.9292	0.7225

Tabela 16

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo sham no período 72 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas
1	4.36	5.66	2.33	2.93	25	27	48	47	42.33	49
2	4.96	6.36	2.6	2.4	30.66	22.66	54.33	43.33	52	40
3	4.53	6.43	2.3	1.93	29.33	24.33	40.66	43	41	43
4	3.46	4.6	2.26	2.26	31	21.33	48	42.33	47.66	40.66
5	4.13	5.83	2.7	3.33	30	28.66	49	42.33	48.33	39.66
6	5.7	6.8	2.03	2.33	25.66	23.66	49	49.33	48.66	49.66
Média	4.5233	5.9467	2.37	2.53	28.6083	24.6067	48.165	44.5533	46.6633	43.6633
DP	0.7599	0.78	0.2433	0.5079	2.6115	2.7443	4.3768	2.9189	4.1735	4.5464

Tabela 17

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo sham no período 7 dias. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias
1	2.96	2.3	2.16	0.8	21.66	20	31.33	31.33	32	28.33
2	3.96	5.1	3.2	2.6	33	29	43	41	46.33	43.66
3	4.33	4.2	2.66	2.93	35	33	43.33	42.66	45.33	42.33
4	4.93	4.66	3.13	3.53	33	33	47	43.66	42	42
5	4.33	3.86	4.56	3.06	30.33	32.33	42	43.33	39	43
6	2.83	6.53	2.33	2.26	31	26.66	40.33	37	37.66	37
Média	3.89	4.4417	3.0067	2.53	30.665	28.9983	41.165	39.83	40.3867	39.3867
DP	0.8321	1.4018	0.8672	0.9499	4.7119	5.0905	5.2957	4.8282	5.3302	5.912

Tabela 18

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo sham no período 14 dias. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias
1	6.03	3.76	3.26	3.16	25.33	28	40.66	41	38.33	39.33
2	4.53	3.13	1.76	1.6	28.66	16.33	41.66	35	39.66	35.66
3	6	5.86	2.16	2.03	25.33	24.66	39.66	36.33	42.33	42
4	2.3	3.33	1.56	1.86	28.66	21	40	39.66	42.33	41.66
5	6.2	5.76	2.5	2.33	31	20.33	45	43.33	45	44
6	4.43	4.83	1.66	1.53	27	26.66	41.66	40.33	42.33	39
Média	4.915	4.445	2.15	2.085	27.6633	22.83	41.44	39.275	41.6633	40.275
DP	1.5029	1.2101	0.6473	0.6021	2.2113	4.3954	1.9298	3.0864	2.3491	2.9184

Tabela 19

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo TB no período 2 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas	Basal	2 horas
1	8.1	5.5	6.2	4.1	22	17.3	40.7	26.3	35.1	24.3
2	11.2	7.3	8.5	5.1	23.5	18	42	30.1	40.6	29.4
3	13.5	9.7	11.4	8.7	25.7	18.3	45.3	31.6	42.2	29.3
4	9.8	6.5	8.2	5.5	27.5	22.8	47.2	36.5	48.9	37.7
5	12.3	8.1	9.7	6.6	23.1	16.4	43.5	33.3	41.1	30.9
6	10.5	7.7	8.9	5.5	28.2	22.4	46.3	35.8	43.4	31.8
Média	10.9	7.46	8.81	5.91	25	19.2	44.16	32.26	41.88	30.56
DP	1.898	1.433	1.719	1.582	2.523	2.716	2.537	3.8	4.47	4.353

Tabela 20

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do TB no período 6 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas	Basal	6 horas
1	7.5	16.8	2.86	8.4	32.66	31.66	46.6	43.6	45.33	41
2	4.73	12.06	3.43	10.93	34.66	33.33	51	43.6	48	41
3	4.23	13.3	2.96	10.83	33.66	32.66	52	44.6	51	43.66
4	4.76	12.1	2.53	9.26	31.33	35.66	50	48	48	46.33
5	7.03	10.3	3.86	9.33	30.66	33	53	51	52.6	51
6	7.4	12.93	2.2	7.93	30.66	31	45	43	44.6	42.33
Média	5.9417	12.915	2.9733	9.4467	32.2717	32.885	49.6	45.6333	48.255	44.22
DP	1.5188	2.1668	0.6004	1.2295	1.6652	1.6135	3.1496	3.1835	3.1132	3.8741

Tabela 21

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento TB no período 24 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas	Basal	24 horas
1	5.13	1.13	3.4	1.56	28	0	43	0	41.33	0
2	6.16	2.06	3.2	0.9	28.66	0	41	0	43.66	0
3	5.76	2.86	3.1	2.33	33.33	12.66	44.66	0	46.33	0
4	6.7	2.26	2.9	1.16	30.66	8	41.66	0	42.33	0
5	4.43	1.86	2.56	1.8	22	0	41.33	0	44	0
6	5.36	1.93	2.7	1.7	29.66	10.66	41.66	0	43.33	0
Média	5.59	2.0167	2.9767	1.575	28.7183	5.22	42.2183	0	43.4967	0
DP	0.7995	0.564	0.3163	0.5029	3.7836	5.9063	1.3762	0	1.6965	0

Tabela 22

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo TB no período 72 horas. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas	Basal	72 horas
1	6	8.2	2.4	6.9	31.5	27	41	41	42.2	40.3
2	6	8.3	2.4	6.7	31.1	36.6	41	41	41	39
3	6.4	8.8	2.7	6.4	31.3	32	41.3	42.1	41.6	39
4	6.7	9.4	2.5	6.3	30.3	25.6	42.3	41.6	40.3	40.8
5	6.1	9.3	2.6	7.1	30.6	31	41	40	42	41
6	5.6	9.2	2.7	6.9	32	30.6	40	40.3	40.6	39
Média	6.1333	8.8667	2.55	6.55	31.1333	30.4667	41.1	41	41.2833	39.85
DP	0.3777	0.5203	0.1378	0.437	0.6154	3.898	0.7376	0.7823	0.7705	0.9586

Tabela 23

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo TB no período 7 dias. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias	Basal	7 dias
1	5.4	7.6	1.8	3.1	31	26	39.1	41.3	39.7	37.6
2	5.4	7.2	2.2	3.3	31.4	26.8	40	40.7	39.3	38.2
3	5.5	8.6	2.3	3.3	30.8	23.1	40.1	42.9	39.6	37.2
4	5.2	6.9	2.1	3.4	30.6	26.5	39.8	41	39.6	38.3
5	5.63	6.63	1.73	3.53	29.33	29.33	39.76	40.13	39.4	39.03
6	5.46	6.33	2.2	3.36	29.1	29.53	39.76	39.93	40	40
Média	5.4317	7.21	2.055	3.3317	30.3717	26.8767	39.7533	40.9933	39.6	38.3883
DP	0.1418	0.8113	0.2344	0.1418	0.937	2.3765	0.3493	1.0669	0.2449	1.0086

Tabela 24

Valores numéricos da perfusão tecidual por compartimento do grupo TB no período 14 dias. Valor expresso em unidades de perfusão tecidual (TPUs).

Animais / Órgãos	Jejuno		Íleo		Fígado		RD		RE	
	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias	Basal	14 dias
1	5.56	7.13	3.5	5.26	25.66	28.66	38.6	32	41	33
2	6.3	7.43	3.06	8.36	35	27	45	37.3	45	39.4
3	5.63	6.4	4.63	5.33	30.66	25.76	45	25	41	31.3
4	5.16	5.73	3.1	3.26	30	24.33	45	33	43.53	29.93
5	5.63	7.8	2.16	5.13	24	31.3	43.6	40.6	44	41.3
6	6.46	7.86	1.63	3.73	29	32	44.6	40.3	43.3	41
Média	5.79	7.0583	3.0133	5.1783	29.0533	28.175	43.6333	34.7	42.9717	35.9883
DP	0.4919	0.8407	1.049	1.7851	3.896	3.0538	2.5248	5.9532	1.635	5.1494

Anexo 6

Leucograma

Tabela 25

Valores numéricos dos leucócitos do sangue ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em mil células / mm³.

Animais / Leucócitos no sangue					
	Sham 2h	Sham 6h	Sham 24h	Sham 72h	Sham 14d
1	11.3	8.5	5.8	3.4	5.3
2	4.5	7.5	4.4	2	6
3	3.2	7.8	4.3	3.9	5.5
4	5.5	8.3	5	2.8	6.1
5	6.3	9.1	4.1	3.1	5.8
Média	6.16	8.24	4.72	3.04	5.74
DP	3.0981	0.6229	0.6907	0.7092	0.3362

Tabela 26

Valores numéricos dos leucócitos do sangue ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em mil células / mm³.

Animais / Leucócitos no sangue					
	TB 2h	TB 6h	TB 24h	TB 72h	TB 14d
1	11.7	11.7	4.3	5.9	3.7
2	8.7	14.6	5.9	2.3	3.8
3	4.1	10.5	3.6	6.7	5.7
4	6.7	8.9	5.0	5.6	10
5	4.6	5.6	6.3	2.1	5
6	11.1	4.4	4.7	3.1	2.3
7	12.7	8	5.5	8.7	10.2
8	2.6	8.2	4.7	5.8	4.7
9	3.7	8.6	5.8	7.4	5.9
10	4.2	8.1	4.4	6.2	6
Média	7.01	8.86	5.02	5.38	5.73
DP	3.751	2.9068	0.8417	2.1974	2.5717

Anexo 7

Linfograma

Tabela 27. Valores numéricos das células da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / céls/mm ³						
	Sham 2h	Sham 6h	Sham 24h	Sham 72h	Sham 7d	Sham 14d
1	3122	370	100	6060	20420	13180
2	8100	820	4400	11760	12190	9300
3	4480	570	500	7200	14130	10160
4	3600	940	400	10100	17120	9910
5	1065	830	1480	9500	15480	9800
6	9282	420	2600	8150	18240	12230
Média	4941.5	658.3333	1580	8795	16263.333	10763.333
DP	3135.8	237.7744	1658.433	2070.3406	2955.5282	1559.0339

Tabela 28. Valores numéricos das células da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / céls/mm ³						
	TB 2h	TB 6h	TB 24h	TB 72h	TB 7d	TB 14d
1	13680	5090	6210	14790	17850	25970
2	18110	2420	4620	4655	15875	10720
3	17100	4320	4720	6000	16400	12480
4	3100	2550	5200	9780	17340	13720
5	23796	2730	5740	12340	15970	15750
6	16500	3810	4945	11120	17000	11470
Média	15381	3486.6667	5239.1667	9780.8333	16739.167	15018.333
DP	6872.89	1091.5433	621.9841	3847.1631	789.4835	5651.0085

Anexo 8

Citometria de Fluxo

Tabela 29

Porcentagem de linfócito T da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD3						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	79,6	79	86,9	85,2	68,6	78,8
2	80,8	76,9	90,8	88,9	86,6	85,6
3	79	91,1	55,2	81,4	70,7	93,8
Média	79.3333	82	77	84.6667	74.6667	85.3333
DP	0.5774	7.9373	19.1572	3.5119	9.8658	7.5056

Tabela 30

Porcentagem de linfócito B da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD45RA						
	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	12,3	8,26	7,61	5,74	15,3	10,3
2	9,5	15,8	5,43	6,76	4,51	6,24
3	11,4	4,62	19,1	7,94	17,4	2,47
Média	10.6667	9	10.3333	6	12	6
DP	1.5275	5.5678	7.5719	1	7	4

Tabela 31

Porcentagem de linfócito Tauxiliar da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD4	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	70,3	73,3	84,9	69,2	80,5	77,1
2	76,6	74,2	82	71,9	74,3	72,2
3	64,7	82,4	58,4	77	66,3	83,4
Média	70	76.3333	74.6667	72.3333	73.3333	77.3333
DP	6	4.9329	14.4684	4.1633	7.0238	5.5076

Tabela 32

Porcentagem de linfócito Tcitotóxico da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD8	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	24,2	19,2	10,9	26,5	15,37	17,83
2	15,2	16,1	13,3	15,1	10,6	13,8
3	16	10,2	21,6	11,6	15,3	9,98
Média	18.3333	15	14.6667	17.3333	13.3333	13
DP	4.9329	4.5826	5.6862	7.7675	2.8868	4

Tabela 33

Porcentagem de linfócito Tauxiliar *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD4 naive	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	57.37	60.04	59.4	60.83	71.61	62.96
2	44.63	62.47	61.68	47.1	56.51	39.89
3	41.62	51.21	47.79	73.07	44.68	52.41
Média	47.8733	57.9067	56.29	60.3333	57.6	51.7533
DP	8.3609	5.9254	7.449	12.9921	13.498	11.549

Tabela 34

Porcentagem de linfócito Tauxiliar memória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / % CD4 memória	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	42.63	39.96	40.6	39.17	28.39	37.04
2	55.37	37.53	38.32	52.9	43.49	60.11
3	58.38	48.79	52.51	26.93	55.32	47.59
Média	52.1267	42.0933	43.81	39.6667	42.4	48.2467
DP	8.3609	5.9254	7.6202	12.9921	13.498	11.549

Tabela 35

Porcentagem de linfócito Tauxiliar ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais /						
%CD4/CD25						
	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	12.77	11.4	6.26	15.51	15.58	14.09
2	10.52	22.56	17.5	21.07	16.79	6.26
3	22.96	9.33	12.28	13.03	15.13	12.26
Média	15.4167	14.43	12.0133	16.5367	15.8333	10.87
DP	6.6289	7.1165	5.6247	4.1172	0.8585	4.0959

Tabela 36

Porcentagem de linfócito Tcitotóxico *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais /						
%CD8 naive						
	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	81.11	82.16	66.48	84.95	86.7	81.94
2	67.75	81.84	84.08	73.24	67.85	60.43
3	63.98	79.07	53.4	84.58	69.08	77.93
Média	70.9467	81.0233	67.9867	80.9233	74.5433	73.4333
DP	9.0013	1.6992	15.3954	6.6565	10.5459	11.4383

Tabela 37

Porcentagem de linfócito Tcitotóxico memória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / %CD8 memória	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	18.89	17.84	33.52	15.05	13.3	18.06
2	32.25	32.25	15.92	26.76	32.15	39.57
3	36.02	20.93	46.6	15.42	30.92	22.07
Média	29.0533	23.6733	32.0133	19.0767	25.4567	26.5667
DP	9.0013	7.5866	15.3954	6.6565	10.5459	11.4383

Tabela 38

Porcentagem de linfócito Tcitotóxico ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham.

Animais / %CD8/CD25	2h Sham	6h Sham	24h Sham	72h Sham	7d Sham	14d Sham
1	2.22	1.73	4.54	5.91	5.09	3.11
2	6.16	3.03	5.18	4.2	6.49	0.15
3	8.6	2.38	3.89	5.31	6.81	5.59
Média	5.66	2.1367	4.5367	4.8367	6.13	2.9133
DP	3.2193	1.0366	0.645	0.5727	0.9148	2.721

Tabela 39

Porcentagem de linfócito T da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD3	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	85,7	86,9	79,7	83,1	84,1	78,1
2	91,5	91,5	80,1	79,8	71,1	89,3
3	67,6	69,8	76,3	76,4	74	79,9
4	82,9	76,5	73,3	90,8	87,2	85,9
Média	81.25	80.5	77	82	79	82.75
DP	10.2103	9.8826	3.1623	6.0553	7.7028	5.1881

Tabela 40

Porcentagem de linfócito B da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD45RA	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	3,87	4,5	9,74	4,57	3,56	12
2	2,5	3,3	10,97	10,45	14,61	3,25
3	19,06	14	14,13	8,43	18,63	12,15
4	9,67	16,28	17,82	8,14	8,27	10,49
Média	8.25	9.25	12.5	7.5	10.75	9.25
DP	7.8049	6.702	3.6968	2.5166	6.6018	4.272

Tabela 41

Porcentagem de linfócito Tauxiliar da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD4	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	82,8	75	77,7	75,2	79,2	78,1
2	87,83	78,8	71,52	76,42	68,53	74,33
3	71,85	75,72	75,68	70,49	74,41	78,87
4	66,34	70,13	70,27	69,29	75,76	77,58
Média	76.5	74.5	73.25	72.5	74	76.75
DP	9.6782	3.3166	3.304	3.5119	4.5461	1.893

Tabela 42

Porcentagem de linfócito Tcitotóxico da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD8	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	11,5	19,3	15,4	19,3	15,5	16,5
2	7,71	15,62	18,74	15,51	17,58	17,10
3	14,06	9,42	13,14	22,8	12,38	14,33
4	21,85	20,18	20,45	21,59	12,52	13,25
Média	13.25	15.75	16.5	19.25	14	15
DP	5.909	4.9917	3.1091	3.0957	2.4495	1.8257

Tabela 43

Porcentagem de linfócito Tauxiliar *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD4 naive	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	65.71	51.88	57.28	58.02	55.73	58.79
2	57.27	59.41	62.23	58.29	57.07	62.61
3	41.72	48.18	59.18	36.24	60.64	71.97
4	52.53	61.88	55	24.11	59.29	58.62
Média	54.3075	55.3375	58.4225	44.165	58.1825	62.9975
DP	10.0066	6.392	3.0599	16.8966	2.1999	6.2589

Tabela 44

Porcentagem de linfócito Tauxiliar memória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD4 memória	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	34.29	48.12	42.72	41.98	44.27	41.21
2	42.73	40.59	37.77	41.71	42.93	37.39
3	58.28	51.82	40.82	63.76	39.36	28.03
4	47.47	38.12	45	75.89	40.71	41.38
Média	45.6925	44.6625	41.5775	55.835	41.8175	37.0025
DP	10.0066	6.392	3.0599	16.8966	2.1999	6.2589

Tabela 45

Porcentagem de linfócito Tauxiliar ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD4/CD25	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	18.09	16.96	23.69	16.37	11.95	11.02
2	11.35	16.28	11.15	18.67	17.09	19.82
3	10.35	8.12	14.77	18.93	12.46	21.39
4	18.2	14.4	11.88	12.15	18.12	9.85
Média	14.4975	13.94	15.3725	16.53	14.905	15.52
DP	4.2317	4.0282	5.7611	3.1384	3.1528	5.9258

Tabela 46

Porcentagem de Tcitotóxico *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD8 naive	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	80.01	78.97	78.93	65.33	79.42	78.11
2	70.76	77.92	75.67	65.66	79.64	77.85
3	68.64	60.97	79.99	76.68	80.59	83.1
4	76.49	80.62	83.11	66.06	78.47	81.82
Média	73.975	74.62	79.425	68.4325	79.53	80.22
DP	5.2136	9.1676	3.0683	5.5064	0.8701	2.6409

Tabela 47

Porcentagem de Tcitotóxico memória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD8 memória	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	19.99	21.03	21.07	34.67	20.58	21.89
2	29.24	22.08	24.33	34.34	20.36	22.15
3	31.36	39.03	20.01	23.32	19.41	16.9
4	23.51	19.38	16.89	33.94	21.53	18.18
Média	26.025	25.38	20.575	31.5675	20.47	19.78
DP	5.2136	9.1676	3.0683	5.5064	0.8701	2.6409

Tabela 48

Porcentagem de Tcitotóxico ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB.

Animais / %CD8/CD25	2h TB	6h TB	24h TB	72h TB	7d TB	14d TB
1	9.76	2.43	5.8	6.38	6.28	5.59
2	2.64	0.52	1.36	6.77	6.23	6.94
3	8.13	3.08	3.23	6.26	2.83	2.52
4	8.61	5.34	3.54	2	1.68	4.08
Média	7.285	2.8425	3.4825	5.3525	4.255	4.7825
DP	3.1713	1.9881	1.8205	2.2456	2.3567	1.9078

Anexo 9

Correlação Citometria de Fluxo e Linfograma

Tabela 49. Valores numéricos dos linfócitos TCD3 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / CD3						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	2466	303	77	5090	15110	11203
2	6399	672	3388	9878	9020	7905
3	3539	467	385	6048	10456	8636
4	2844	770	308	8484	7488	8423
5	841	680	1139	7980	11455	8330
6	7332	344	2002	6848	13497	10395
Média	3903.5	539.3333	1216.5	7388	11171	9148.6667
DP	2477.2099	194.8514	1277.0007	1738.9528	2818.1259	1325.1395

Tabela 50. Valores numéricos dos linfócitos TCD3 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / CD3						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	11080	4072	4781	12127	14101	21295
2	14669	1936	3557	3817	12541	8790
3	13851	3456	3634	4920	12956	10233
4	2511	2040	4004	8019	13698	11250
5	19274	2184	4419	10118	12616	12915
6	13365	3048	3807	9118	13430	9405
Média	12458.333	2789.3333	4033.6667	8019.8333	13223.667	12314.667
DP	5566.8872	873.2346	478.7883	3154.3578	623.5731	4633.8553

Tabela 51

Valores numéricos dos linfócitos B da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / CD45RA						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	312	33	10	363	2450	2337
2	810	73	440	705	1462	964
3	448	51	50	432	1695	1123
4	360	84	40	606	2054	1234
5	106	74	148	570	1857	1417
6	928	37	260	489	2188	1147
Média	494	58.6667	158	527.5	1951	1370.3333
DP	313.6724	21.3041	165.8433	124.2075	354.7596	496.2595

Tabela 52

Valores numéricos dos linfócitos B da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / CD45RA						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	1094	458	745	1035	1785	2337
2	1448	217	554	325	1587	964
3	1368	388	566	420	1640	1123
4	248	229	624	684	1734	1234
5	1903	245	688	863	1597	1417
6	1320	342	593	778	1700	1147
Média	1230.1667	313.1667	628.3333	684.1667	1673.8333	1370.3333
DP	549.6211	98.3736	74.6315	269.3157	79.058	496.2595

Tabela 53

Valores numéricos dos linfócitos TCD4 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / CD4	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	1726	230	57	3664	11030	8626
2	4479	510	2507	7112	6584	6086
3	2477	354	285	4354	7632	6649
4	1990	585	227	6108	5466	6485
5	588	516	842	5745	8362	6414
6	5132	261	1481	4930	9852	8004
Média	2732	409.3333	899.8333	5318.8333	8154.3333	7044
DP	1734.1494	148.0509	945.0055	1252.2314	2057.2103	1020.5385

Tabela 54

Valores numéricos dos linfócitos TCD4 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / CD4	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	8420	3013	3490	8731	10434	16184
2	11148	1432	2591	2748	9280	6680
3	10526	2557	2652	3542	9587	7777
4	1908	1509	2922	5773	10136	8550
5	14648	1616	3225	7284	9335	9815
6	10157	2255	2779	6564	9938	7147
Média	9467.8333	2063.6667	2943.1667	5773.6667	9785	9358.8333
DP	4230.8578	646.2636	350.6151	2270.9711	461.4195	3521.8106

Tabela 55

Valores numéricos dos linfócitos TCD8 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / CD8		2h	6h	24h	72h	7d	14d
1		443	45	10	865	1964	1456
2		1151	100	474	1679	1172	1027
3		637	70	54	1028	1359	1122
4		511	115	43	1442	973	1094
5		151	102	159	1356	1489	1082
6		1319	51	280	479	1754	1351
Média		702	80.5	170	1141.5	1451.8333	1188.6667
DP		445.7977	29.2353	178.7859	436.6824	366.3896	172.4757

Tabela 56

Valores numéricos dos linfócitos TCD8 da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / CD8		2h	6h	24h	72h	7d	14d
1		1440	610	764	2304	1974	3194
2		1906	290	569	725	1755	1318
3		1800	518	581	934	1813	1534
4		326	306	640	1523	1917	1687
5		2505	327	707	1922	1766	1937
6		1737	457	609	1732	1880	1410
Média		1619	418	645	1523.3333	1850.8333	1846.6667
DP		723.5938	130.8388	76.4173	599.4276	87.4195	695.2535

Tabela 57

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliarnaive da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor expresso em células / mm³.

Animais-Sham / CD4naive						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	811	131	32	2198	6287	4399
2	2105	290	1403	4267	3752	3103
3	1164	201	159	2612	4350	3390
4	935	333	127	3664	3115	3307
5	276	294	471	3447	4766	3271
6	2412	148	829	2958	5615	4082
Média	1283.8333	232.8333	503.5	3191	4647.5	3592
DP	815.1587	84.4071	528.9332	751.3481	1172.778	520.6803

Tabela 58

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliarnaive da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB / CD4naive						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	4546	1657	2024	3841	6051	10195
2	6019	787	1502	1209	5382	4208
3	5684	1406	1538	1558	5560	4899
4	1030	829	1694	2540	5878	5386
5	7909	888	1870	3204	5414	6283
6	5484	1240	1611	2888	5764	4502
Média	5112	1134.5	1706.5	2540	5674.8333	5912.1667
DP	2284.4915	355.7239	203.4834	999.0481	267.4699	2221.5441

Tabela 59

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliarmemória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor em células/mm³.

Animais-Sham						
/ CD4memoria						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	897	96	24	1428	4632	4140
2	2329	214	1078	2773	2765	2921
3	1288	148	122	1698	3205	3191
4	1034	245	97	2382	2295	3112
5	305	216	362	2240	3512	3078
6	2668	109	636	1922	4137	3841
Média	1420.1667	171.3333	386.5	2073.8333	3424.3333	3380.5
DP	901.8823	62.205	406.4971	488.4295	863.9745	489.806

Tabela 60

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliarmemória da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor em células/mm³.

Animais-TB /						
CD4memoria						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	3789	1325	1430	4802	4277	5988
2	5016	630	1062	1511	4083	2471
3	4736	1122	1087	1948	3930	2877
4	858	663	1198	3175	4155	3163
5	6591	711	1322	4006	3827	3631
6	4570	992	1139	3610	4074	2644
Média	4260	907.1667	1206.3333	3175.3333	4057.6667	3462.3333
DP	1903.8497	283.8503	143.5837	1249.1068	159.9971	1303.2319

Tabela 61

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliar ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor em células/mm³.

Animais-Sham						
/ CD4/CD25						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	259	32	6	586	1654	862
2	671	71	300	1137	987	608
3	371	49	34	696	1144	664
4	298	81	27	977	819	648
5	88	72	101	919	1254	641
6	769	36	177	788	1477	800
Média	409.3333	56.8333	107.5	850.5	1222.5	703.8333
DP	259.8266	20.6244	113.2374	200.2566	308.6712	102.0792

Tabela 62

Valores numéricos dos linfócitos Tauxiliar ativado da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB /						
CD4/CD25						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	1178	412	523	1396	1460	2427
2	1560	200	388	439	1299	1002
3	1473	357	397	566	1342	1166
4	267	211	438	923	1418	1282
5	2050	226	483	1165	1306	1472
6	1421	315	416	1050	1391	1072
Média	1324.8333	286.8333	440.8333	923.1667	1369.3333	1403.5
DP	592.1052	87.6069	52.6628	363.353	64.4412	528.1113

Tabela 63

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor em células/mm³.

Animais-Sham						
	/ CD8naive					
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	310	494	6	700	1453	1062
2	805	234	322	1359	867	749
3	445	419	36	832	1005	819
4	357	247	29	1168	720	798
5	105	264	108	1098	1101	789
6	923	370	190	388	1297	986
Média	490.8333	338	115.1667	924.1667	1073.8333	867.1667
DP	312.1054	106.2958	121.6888	353.5457	270.9335	125.9038

Tabela 64

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico *naive* da linfa mesentérica eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor expresso em células / mm³.

Animais-TB /						
	CD8naive					
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	1065	451	603	1566	1559	2555
2	1410	214	449	493	1386	1054
3	1332	383	458	635	1432	1227
4	241	226	505	1035	1514	1349
5	1853	241	558	1306	1395	1549
6	1285	338	481	1177	1485	1128
Média	1197.6667	308.8333	509	1035.3333	1461.8333	1477
DP	535.3562	96.973	60.3954	407.2663	69.0027	556.2161

Tabela 65

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico memória da linfa mesentérica
eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor em células/mm³.

Animais-sham						
/ CD8memoria						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	128	3	491	374	152	394
2	333	151	293	495	113	351
3	184	17	339	468	116	362
4	148	13	243	84	128	383
5	43	50	372	651	141	353
6	382	89	438	451	121	376
Média	203	53.8333	362.6667	420.5	128.5	369.8333
DP	129.2687	30.2087	57.0979	82.8342	91.6137	44.9596

Tabela 66

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico memória da linfa mesentérica
eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor em células/mm³.

Animais-TB /						
CD8memoria						
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	140	164	378	152	714	606
2	66	319	267	72	224	250
3	119	195	291	129	289	291
4	70	273	284	76	472	320
5	75	257	281	81	595	387
6	105	91	352	370	536	267
Média	95.8333	216.5	308.8333	146.6667	471.6667	353.5
DP	188.2878	114.1046	15.2414	185.8932	17.2907	132.7415

Tabela 67

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico ativado da linfa mesentérica
eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo Sham. Valor em células/mm³.

Animais-Sham						
	/ CD8/CD25					
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	22	12	4	34	117	43
2	57	34	19	67	70	30
3	31	62	2	41	81	33
4	25	36	1	57	58	32
5	7	39	6	54	89	32
6	65	54	11	19	105	40
Média	34.5	39.5	7.1667	45.3333	86.6667	35
DP	22.1427	17.4098	6.7946	17.4432	21.8785	5.2154

Tabela 68

Valores numéricos dos linfócitos Tcitotóxico ativado da linfa mesentérica
eferente ao longo dos períodos de estudo, do grupo TB. Valor em células / mm³.

Animais-TB /						
	CD8/CD25					
	2h	6h	24h	72h	7d	14d
1	100	12	23	115	79	127
2	133	5	17	36	70	52
3	126	10	17	46	72	61
4	22	6	19	76	76	67
5	175	6	21	96	70	77
6	121	9	18	86	75	56
Média	112.8333	8	19.1667	75.8333	73.6667	73.3333
DP	50.8465	2.7568	2.4014	30.0694	3.6148	27.7176

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITACAO DE AUXÍLIO

PROCESSO Nº 2005/53826-7

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada **OUTORGANTE**, usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:

OUTORGADO
IVAN HONG JUN KOH
CPF: 220.562.111-49



INSTITUIÇÃO

05 075 001 - ESC PAULISTA MEDICINA/UNIFESP

LINHA DE FOMENTO

AUXILIO PESQUISA - REGULAR

PROJETO

ESTUDO DO MECANISMO(S) DA VIA INTESTINAL DE ATIVACAO IMUNOLOGICA ASSOCIADA A TRANSLOCACAO BACTERIANA: DIRECIONAMENTO PARA A AREA DE TRANSPLANTE DO INTESTINO DELGADO.

ÁREA

04010000 - MEDICINA

PERÍODO

01/09/2005 a 31/08/2007

RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ:

30/08/2006, 30/08/2007

PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ:

30/08/2006, 30/08/2007

OBSERVAÇÕES

- Qualquer alteracao na destinacao dos recursos concedidos, inclusive a utilizacao de saldos resultantes de diferenca entre os precos previstos no projeto e os precos efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante.
- Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que nao sejam manifestamente necessarios a realizacao deste projeto, a Outorgante podera impugnar as despesas correspondentes na prestacao de contas.
- Imediatamente apos a apresentacao do relatorio científico estabelecido pela FAPESP como relatorio final, o saldo acaso existente sera automaticamente cancelado.
- O Outorgado reconhece que o auxilio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execucao do projeto, salvo circunstancias imprevisiveis no ato da assinatura. Solicitacoes de qualquer alteracao de orcamento, exceto em casos emergenciais, poderao ser apresentadas por ocasio da apresentacao do(s) relatorio(s) científico(s).
- Em se tratando de projetos da area de arqueologia, o Outorgado devera adequar-se ao que determina a Constituicao Federal e a Lei numero 3924/61, devendo contactar o IPHAN (www.iphan.gov.br).
- A aquisicao de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituicao na CNEN.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de maio de 2005.
CEP 1202/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LUCIANO VILELA-OLIVEIRA
Disciplina/Departamento: Téc. Op. Cir. Exp./Cirurgia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo dos componentes humorais e celulares da linfa mesentérica ativada pelo processo de translocação bacteriana e seu efeito na provocação da lesão da microcirculação**".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme estabelecido pelo CEP/UNIFESP, são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Apresentar primeiro relatório parcial em **16/novembro/2005**.
3. Apresentar primeiro relatório parcial em **15/maio/2006**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa".